



Deteção de fungos do género *Ilyonectria* em viveiro vitícola

Margarida do Nascimento Cardoso

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientador: Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira

Júri:

Presidente - Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais - Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, na qualidade de especialista;

- Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011

AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e contributo de forma directa ou indirecta de várias pessoas, às quais gostaria de agradecer, em particular:

à Doutora Maria Helena Correia de Oliveira, minha orientadora, pela disponibilidade manifestada na orientação deste trabalho, pela revisão crítica do texto, pela cedência e indicação de alguma bibliografia, pelos esclarecimentos, opiniões e sugestões.

à Engenheira Cecília Rego pela disponibilidade e ajuda prestada no decorrer do trabalho prático, cedência e indicação de alguma bibliografia e pelos esclarecimentos prestados.

à Engenheira Ana Cabral pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas, cedência de informação e material de estudo, assim como pela orientação nos procedimentos.

à Engenheira Inês Diniz, a quem deixo um muito especial agradecimento pelo incentivo, pelas sugestões, pelo esclarecimento de dúvidas, pela boa companhia e pela ajuda nas saídas de campo e no laboratório, pela disponibilidade em ajudar-me fora do horário de trabalho, pela amizade, pela muita paciência e principalmente pela preciosa ajuda no trabalho prático sem a qual não seria possível a realização do presente trabalho.

aos viveiristas pela colaboração imediata, pela cedência de material de estudo e pelos ensinamentos práticos.

aos Engenheiros Ana Teresa Vaz, Pedro Reis e Marta Rocha por toda a ajuda prestada, pela disponibilização de material e a quem agradeço pelos divertidos momentos que passámos juntos.

a todos os funcionários e investigadores do Laboratório de Patologia Vegetal "Veríssimo de Almeida" por toda a ajuda prestada.

aos meus colegas e amigos, em especial à Adriana Silva pela amizade, pela paciência em ouvir os meus desabafos quando mais precisei.

à minha família, o meu maior agradecimento. Aos meus tios pelo apoio prestado. À minha prima Judite Agostinho pela ajuda concedida e pela amizade. À minha prima Célia Cardoso, pela disponibilização de elementos integrantes no trabalho, pelas sugestões, por todo o apoio e pela amizade. À minha irmã Vânia Cardoso pela paciência, pela preciosa ajuda quando necessitei e pelo companheirismo e amizade. Um especial agradecimento aos meus

pais, pela oportunidade que me deram de alcançar o grau académico a que me propus e a quem devo muito daquilo em que me tornei. Ao meu pai pelo apoio, pelos ensinamentos transmitidos, pelas sugestões, pelo incentivo e pela contribuição para o desenvolvimento do meu espírito crítico. À minha mãe pelo apoio e incentivo em continuar nos momentos mais difíceis, pela paciência, por ouvir os meus problemas e por me orientar na resolução dos mesmos, pela companhia e pela confiança e esperança que depositou em mim.

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do projecto PTDC/AGR-AAM/099324/2008.

RESUMO

O pé-negro da videira é uma importante doença causada essencialmente por fungos do género *Ilyonectria*. Afecta viveiros vitícolas e vinhas jovens, originando o declínio e a morte das plantas. Em viveiro, as contaminações são principalmente atribuídas a materiais de propagação infectados e a inóculo existente no solo, o que dificulta a selecção de material vegetativo são. No presente estudo pretendeu-se detectar/identificar possíveis fontes de inóculo para *Ilyonectria* spp. e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*, igualmente associado à doença, ao longo das diversas fases do processo de propagação da videira. Através de técnicas clássicas e biomoleculares (nested-PCR e Multiplex nested-PCR), analisaram-se amostras de material vegetal (plantas-mãe de porta-enxertos e de garfos, estacas enxertadas e enxertos-prontos), solo (de vinhas-mãe, viveiro vitícola e parcelas em rotação), substrato (antes e após a estratificação), ar das câmaras e armazéns, água dos tanques de hidratação e da torneira, instrumentos de corte e parafina. A técnica Multiplex nested-PCR revelou-se mais sensível e expedita do que as técnicas clássicas na identificação simultânea de *I. liriodendri* e/ou *I. macrodidyma* e/ou "*C.*" *pauciseptatum* e permitiu referenciar fontes de inóculo desconhecidas para *Ilyonectria* spp. (ex. substrato e água de tanques de hidratação). Estes estudos deverão ser prosseguidos de forma a comprovar-se a viabilidade do inóculo detectado.

Palavras-chave: Pé-negro, *Ilyonectria* spp., "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*., nested-PCR, Multiplex nested-PCR, isolamento microbiológico

ABSTRACT

Black foot of grapevine is an important disease caused primarily by fungi of the genus *Ilyonectria*. These pathogens affect grapevine nurseries and young vineyards, causing the decline and death of plants. In the nursery, the infections are mainly attributed to infected propagation material and soilborne inoculum, thus hampering the selection of healthy plant material. The aim of this study was to detect/identify possible sources of inoculum for *Ilyonectria* spp. and "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*, also associated with the disease, throughout the different nursery stages. Samples of plant material (rootstock and scion mother plants, grafted-cuttings and rooted graftlings), soil (from mother-fields, nurseries and plots in rotation), callusing-medium (before and after utilization), air chambers and warehouses, water from hydration tanks and tap water, cutting tools and paraffin, were analysed by classical and molecular techniques (nested-PCR and multiplex nested-PCR). Multiplex nested-PCR revealed to be more sensitive and fast than classical technique, allowing the simultaneous detection of *I. liriodendri* and/or *I. macrodidyma* and/or "*C.*" *pauciseptatum* and the identification of unknown inoculum sources for these fungi (eg. callusing-medium and water samples). These studies should be pursued in order to confirm the viability of the inoculum detected.

Key words: Black-foot, *Ilyonectria* spp., "*Cylindrocarpon*" spp., nested-PCR, Multiplex nested-PCR; microbiological isolation

EXTENDED ABSTRACT

Black foot of grapevine is an important disease caused primarily by fungi of the genus *Ilyonectria*, being *I. liriodendri* and *I. macrodidyma* the most important and widespread species. "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* could also be involved. These pathogens affect grapevine nurseries and young vineyards, causing the decline and death of plants. The typical symptoms in young plants are black discoloration and gum inclusions in xylem vessels on the basal-end of affected rootstocks and root biomass reduction.

Species of *Ilyonectria* and "*Cylindrocarpon*" are commonly known to be saprobes in soil and occur on dead plant substrata. So, it is known that even apparently healthy grafted plants are infected during the rooting process in open-field nurseries, from soilborne inoculum, thus hampering the selection of healthy grapevine plant material. The role of rootstock mother vines as a primary source of grapevine trunk pathogens, in general, has been well-documented. However, the incidence of *Ilyonectria* and "*Cylindrocarpon*" fungi on canes of such plants has been low and the role of scion mother vines is still unclear.

Ilyonectria and "*Cylindrocarpon*" fungi are thought to be weak pathogens, infecting grapevine under stress conditions, but wounds caused during the stages of grapevine propagation process offer excellent sites for the pathogen penetration. Thus, if inoculum is available, there are many hypothetical opportunities for infection during the different stages of grapevine propagation process, even under warehouse conditions.

In the present study, different sources of *Ilyonectria* spp. and "*Cylindrocarpon*" sp. were detected/identified throughout the different stages of grapevine propagation process using two different approaches: microbiological isolation and molecular techniques.

Samples from rootstock and scion mother plants, grafted-cuttings and rooted graftlings were taken from fields of different nursery growers, to evaluate the incidence of the main grapevine trunk pathogens. The case-study Touriga Nacional/110R was used to exemplify some details of disease incidence along the vine plants and to clarify when and where the materials were exposed to inoculum. Also, in order to deep understand the potential role of soilborne inoculum in the disease cycle, 22 soil samples were collected from mother-fields, nurseries and plots in rotation.

For other grapevine pathogens, mostly *Phaeomoniella chlamydospora*, it is well established that healthy canes taken from mother-vines could also be infected during postharvesting and processing, before the rooting process in open-field nursery take place. To investigate this hypothesis, in what concern *Ilyonectria* fungi, cutting tools, water from hydration tanks, tap

water, callusing-medium (before and after utilization), air from cold-chambers and warehouses and paraffin were sampled too.

Analyses were carried out by microbial isolation onto semi-selective medium (potato dextrose agar amended with chloramphenicol) and by molecular methods, based on nested-PCR and multiplex nested-PCR. Compared to molecular methods, the conventional method of isolation is advantageous because it allows the isolation of a wider range of fungi and enables the detection of only viable cells. By this approach, it was possible to identify not only the black foot pathogens but also the majority of the grapevine wood fungi present in plant materials and other matrices.

The results showed that both the canes of the varieties as rootstocks were infected by *Ilyonectria* spp. and other trunk pathogens. The infection of grapevine varieties (canes) by *Ilyonectria* fungi is unusual, and some hypotheses of contamination are discussed. For the combination Touriga Nacional/110R it was possible to trace possible infection courts and understand the importance of the immersion of cuttings in fungicide before grafting. For all rooted grafted-plants, the highest *Ilyonectria* spp. incidence was recorded at the basal-end of rootstocks.

By the dilution-plating method onto semi-selective medium (PDA plus chloramphenicol), *Ilyonectria* spp. were detected from soil samples with origin in one rootstock-mother field, all scion mother-fields and from three out of nine nursery soils, after the rooting process. The pathogens were also detected from some samples collected in plots accomplishing the rotation cycle. From cutting tools, *Ilyonectria* spp. was detected only from two of three samples of scissors used for cutting of scions. All the remaining samples (callusing medium, air chambers, water and paraffin), except one (air chamber), tested negative for *Ilyonectria* fungi by the dilution-plating method.

Compared to the conventional microbiological methods, nested PCR revealed to be faster and more sensitive on detecting the target pathogens. However the primers pair Dest1 and Dest4, used in the second-round amplification does not allow species identification. To achieve this purpose, a multiplex nested-PCR was applied to soil, substrate and water samples. After the first-round of amplification with the primers ITS4 and ITS1F, three pairs of primers were used in the second-round of amplification, Lir1/Lir2, Mac1/MaPa2 and Pau1/MaPa2, thus allowing the detection of *I. liriodendra*, *I. macrodidyma* and "*C. pauciseptatum*", respectively.

Although DNA-based methods are in general more specific, sensitive, and faster than conventional methods, they have a major drawback, because viable and unviable cells (dead) are targeted. As only viable cells have the potential to incite disease, the method

could overestimate the authentic inoculum. Therefore, positive results obtained by molecular methods require further confirmation by an appropriate method, which, in many instances, is still by culturing.

Apparently, *Ilyonectria* and *Cylindrocarpon* fungi proved to be very ubiquitous during the grapevine propagation process, being present in several matrices, so the improvement of fast and sensitive methods that allow the detection of only viable cells is of outmost importance. To achieve this objective the studies should be pursued and methods improved, in order to confirm the inoculum sources now identified.

The results here presented and those to be obtained in the next future will contribute to the management and control of black foot pathogens, mainly during the different steps of grapevine propagation process, thus improving the quality of planting materials.

ÍNDICE

Agradecimentos	I
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Extended Abstract	V
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Quadros	XIV
Lista de Abreviaturas.....	XV
1. Introdução	1
1.1. Âmbito do Estudo e Objectivos	1
1.2. A actividade viveirista em Portugal.....	3
1.2.1. História dos viveiros	3
1.2.2. Produção de enxertos-prontos.....	4
1.2.3. Principais fungos do lenho que afectam os materiais vitícolas.....	9
1.3. A doença do pé negro da videira	11
1.3.1. Agentes causais	11
1.3.2. Bioecologia.....	12
1.3.3. Sintomas da doença.....	15
1.3.4. Meios de Luta.....	16
1.3.4.1. Luta Cultural.....	17
1.3.4.2. Luta Biológica	17
1.3.4.3. Luta Química.....	18
1.3.4.4. Mistos	20
1.4. Métodos de detecção e quantificação de <i>Cylindrocarpon</i> spp.....	21
2. Material e Métodos.....	25
2.1. Caracterização das amostras e isolamento de fungos	26
2.1.1. Material vegetal	26
2.1.2. Amostras de solo e substrato	28
2.1.3. Monitorização do ar de câmaras e armazéns	30

2.1.4. Água do furo e tanques de hidratação	30
2.1.5. Instrumentos de corte	30
2.1.6. Parafina	31
2.2. Caracterização cultural dos isolados de <i>Ilyonectria</i> e " <i>Cylindrocarpon</i> " spp. obtidos ..	31
2.2.1. Culturas de referência	31
2.2.2. Características avaliadas	32
2.3. Análise de material vegetal, solos e águas por técnicas moleculares	33
2.3.1. Extração, purificação e quantificação de DNA genómico	33
2.3.2. Nested - PCR	36
2.3.3. Multiplex nested- PCR	38
3. Resultados e Discussão	40
3.1. Incidência de <i>Ilyonectria</i> / <i>Cylindrocarpon</i> e de outros fungos do lenho da videira em material vegetal por isolamento microbiológico	40
3.1.1. Estacas de vinhas-mãe de porta-enxertos e de garfos	40
3.1.2. Enxertos-prontos de videira	41
3.1.3. Caso de estudo: casta Touriga Nacional X porta-enxerto 110R	45
3.2 Detecção de fungos <i>Ilyonectria</i> e " <i>Cylindrocarpon</i> " noutras matrizes por isolamento microbiológico	49
3.2.1. Solo	49
3.2.2. Substrato e Águas	49
3.2.3. Atmosfera das câmaras de frio e dos armazéns	50
3.2.4. Instrumentos de corte	50
3.2.5. Parafina	51
3.3. Características culturais dos isolados obtidos de <i>Ilyonectria</i> e " <i>Cylindrocarpon</i> " spp. 51	
3.4. Comparação dos métodos clássicos e biomoleculares aplicados à detecção/identificação de <i>Ilyonectria</i> e " <i>Cylindrocarpon</i> " spp.	55
3.4.1. Material Vegetal	55
3.4.1.1. Vinhas-mãe de porta-enxertos e de garfos	55
3.4.1.2. Enxertos-prontos de videira	56
3.4.1.3. Caso de estudo: casta Touriga Nacional/porta-enxerto 110 R	58

3.4.2. Solo.....	59
3.4.3. Substrato.....	65
3.4.4. Águas.....	66
4. Conclusões e Perspectivas Futuras	68
Referências Bibliográficas	71
ANEXOS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1. Esquematização do processo de produção de enxertos-prontos de videira em viveiro vitícola.....	5
Fig. 1.2. Sintomas associados ao pé-negro da videira em viveiro vitícola: a) corte longitudinal da base de porta-enxerto infectado com necrose na região basal; b) corte transversal da zona da base de porta-enxerto com sintomas; c) corte transversal da zona de enxertia evidenciando necrose.....	15
Fig. 2.1. Esquematização da recolha de amostras ao longo das várias fases do processo de propagação de material vitícola.	25
Fig. 2.2. Ilustração das quatro secções transversais de corte realizadas aos níveis basal, abaixo da enxertia, enxertia e acima da enxertia em enxertos-prontos enraizados utilizados nos isolamentos.....	27
Fig. 3. 1. Incidência (%) de fungos de lenho em estacas destinadas à enxertia. As médias baseiam-se numa amostragem de 10 estacas por porta-enxerto e casta, excepto para 1103P e Aragonez, em que foram analisadas duas amostras de 10 estacas.	40
Fig. 3.2. Incidência (%) de fungos de lenho em enxertos-prontos, após enraizamento em viveiro. Médias referentes a: 60 plantas de 1103P, com origem em quatro viveiros; 40 plantas 110R, com origem em dois viveiros e 20 plantas 99R, oriundas de dois viveiristas.....	42
Fig. 3.3. Incidência (%) de fungos de lenho na região acima da enxertia (casta), após enraizamento em viveiro. Médias referentes a 10 plantas de cada casta enxertadas em 1103P, com origem em quatro viveiristas.	43
Fig. 3.4. Incidência (%) de fungos de lenho na região acima da enxertia (casta), após enraizamento em viveiro. Médias referentes a 10 plantas de cada casta enxertadas em 110R, com origem em dois viveiristas.	43
Fig. 3.5. Incidência (%) de fungos de lenho na região acima da enxertia (casta), após enraizamento em viveiro. Médias referentes a 10 plantas de cada casta enxertadas em 110R, com origem em dois viveiristas.	44
Fig. 3.6. Incidência (%) de fungos de lenho em materiais de propagação vegetativa (estacas) destinados à enxertia do porta-enxerto 110R e da casta Touriga Nacional.	45

- Fig. 3.7. Incidência (%) de fungos de lenho na combinação 110 R X Touriga Nacional, no final do processo de estratificação, considerando quatro locais distintos de isolamento, ao longo das plantas.47
- Fig. 3.8. Incidência (%) de fungos de lenho na combinação 110 R X Touriga Nacional, no final do processo de enraizamento em viveiro, ao ar livre, considerando quatro locais distintos de isolamento, ao longo das plantas.....48
- Fig. 3. 9. Culturas de *Ilyonectria* spp. e "*Cylindrocarpon*" spp. em meio PDA ao fim de 12 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 20 + 1°C. Em cima: face superior. Em baixo: face inferior. *I. radicola*: a e b, CyMC 48; c e d, CyMC 50; e e f, CyMC 40. "*C.*" *pauciseptatum*: g e h, CyMC 43. *I. macrodidyma*: i e j, CyMC 27; k e l, CyMC 39; m e n, CyMC 41; o e p, CyMC 7; q e r, CyMC 8; s e t, CyMC 52; u e v, CyMC 4; w e x, CyMC 11; y e z, CyMC 29; aa e ab, CyMC 47.54
- Fig. 3. 10. Produtos de amplificação por nested-PCR, em gel de agarose 1,2%, utilizando um par de iniciadores específicos Dest1/Dest4 para o género *Ilyonectria* e "*Cylindrocarpon*" para a região acima da enxertia de 10 videiras de Rabigato enxertadas em 110R. M - marcador molecular 123 bp (Invitrogen™,Life Technologies); B - controlo negativo; Cy1 - isolado de *Ilyonectria liriodendri*.57
- Fig. 3. 11. Produtos de amplificação por Multiplex nested-PCR, em gel de agarose 2%, utilizando três pares de iniciadores específicos Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2 e Pau1/MaPa2 para as espécies *Ilyonectria macrodidyma*, *Ilyonectria liriodendri* e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* respectivamente, para os solos 1 a 22. M - marcador molecular 100 bp (Bioron international, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha); B - controlo negativo; Cy1 - isolado de *Ilyonectria liriodendri*; Cy 130 - isolado de *Ilyonectria macrodidyma*; Cy 238/2 - isolado de "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*; Mix - junção dos isolados Cy1, Cy 130 e Cy 238/2.61
- Fig. 3. 12. Produtos de amplificação obtidos por Multiplex nested-PCR, em gel de agarose 2%, utilizando três pares de iniciadores específicos Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2 e Pau1/MaPa2 para as espécies *Ilyonectria macrodidyma*, *Ilyonectria liriodendri* e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* respectivamente, para os substratos 1 (turfa antes da utilização) e 2 (após utilização). M - marcador molecular 100 bp (Bioron international, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha); B - controlo negativo; Cy1 - isolado de *Ilyonectria liriodendri*; Cy 130 - isolado de *Ilyonectria macrodidyma*; Cy 238/2 - isolado de "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*; Mix - junção dos isolados Cy1, Cy 130 e Cy 238/2. ...65
- Fig. 3. 13. Produtos de amplificação por Multiplex nested-PCR, em gel de agarose 2%, utilizando três pares de iniciadores específicos Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2 e Pau1/MaPa2

para as espécies *Ilyonectria macrodidyma*, *Ilyonectria liriodendri* e "*Cylindrocarpon*" *pausicseptatum* respectivamente, para amostras de água dos tanques de hidratação de garfos (G), água dos tanques de hidratação das estacas de porta-enxertos (Pe) e água do furo (F). M - marcador molecular 100 bp (Bioron international, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha); CN e B - controlo negativo; CBS112601 - isolado de *Ilyonectria liriodendri* Cy1 - isolado de *Ilyonectria liriodendri*; Cy 130 - isolado de *Ilyonectria macrodidyma*; Cy 238/2 - isolado de "*Cylindrocarpon*" *pausicseptatum*; Mix - junção dos isolados Cy1, Cy 130 e Cy 238/2.....67

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 2.1. Identificação das amostras de material material destinado à enxertia, material enxertado e enxertos-prontos enraizados provenientes de diferentes viveiros localizados na região Oeste	26
Quadro 2.2. Identificação das amostras de solo provenientes de diferentes viveiros localizados na região Oeste	28
Quadro 2.3. Isolados de referência de <i>Ilyonectria</i> spp. e " <i>Cylindrocarpon</i> " <i>pauciseptatum</i> utilizados para fins comparativos com a colecção obtida no presente estudo.....	32
Quadro 2.4. Iniciadores específicos e tamanho dos produtos de amplificação esperados para as espécies <i>Ilyonectria liriodendri</i> , <i>I. macrodidyma</i> e " <i>Cylindrocarpon</i> " <i>pauciseptatum</i> ..	38
Quadro 3.1. Detecção de espécies de <i>Ilyonectria</i> em amostras recolhidas a partir de instrumentos de corte em várias fases do processo de propagação de videiras enxertadas em viveiro.....	50
Quadro 3. 2. Características culturais de 66 isolados de <i>Ilyonectria</i> spp. e " <i>Cylindrocarpon</i> " spp. em meio PDA e OA ao fim de 12 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 20 + 1°C	52
Quadro 3.3. Incidência (%) de <i>Ilyonectria</i> spp. em estacas destinadas à enxertia.....	55
Quadro 3.4. Incidência (%) de <i>Ilyonectria</i> spp. na zona basal de enxertos-prontos.....	57
Quadro 3.5. Incidência média (%) de <i>Ilyonectria</i> spp. na região acima da enxertia (casta) de videiras enxertadas em 1103P, 110R e 99R.....	58
Quadro 3.6. Incidência média (%) de <i>Ilyonectria</i> spp. em materiais de propagação vegetativa Touriga Nacional/110R, ao longo das diferentes fases do processo de obtenção de enxertos-prontos.....	58
Quadro 3. 7. Presença/ausência de fungos do género <i>Ilyonectria</i> em diferentes solos, ao longo das várias fases de produção de enxertos-prontos.	61
Quadro 3. 8. Concentração de DNA de <i>Ilyonectria</i> spp. em solos de vinhas-mãe de porta-enxertos e de garfos, solos em rotação e solos de viveiro vitícola.....	63
Quadro 3. 9. Presença de <i>Ilyonectria</i> spp. em amostras de água dos tanques de hidratação e furo	66

LISTA DE ABREVIATURAS

BT - Beta-tubulina

CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands

CNPPA - Centro Nacional de Protecção da Produção Agrícola

DGADR - Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural

DGPC - Direcção-Geral de Protecção das Culturas

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleótidos trifosfatados

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

HCl - Ácido clorídrico

ITS - Espaçador Internamente Transcrito

LPVVA - Laboratório de Patologia Vegetal "Veríssimo de Almeida"

NaOCl - Hipoclorito de sódio

OA - Oatmeal Agar

pb - Pares de bases

PCR - Reacção em Cadeia da Polimerase

PDA - Gelose de Batata Dextrosada

qPCR - PCR quantitativa

RFLP - Restriction fragment length polymorphism

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SNAY - "Spezieller Nährstoffarmer Agar" adicionado de 0,1% de extracto de levedura

Taq - *Thermus aquaticus*

TBE - Tris + Ácido Bórico + Ácido Etilenodiaminotetracético

TE - Tampão de Extracção

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

VITICERT - Associação Nacional de Viveirista Vitícolas Produtores de Material Certificado

1. INTRODUÇÃO

1.1. Âmbito do Estudo e Objectivos

O aparecimento dos viveiros vitícolas em Portugal surgiu da necessidade de utilizar porta-enxertos resistentes à filoxera. Inicialmente era utilizada a enxertia de campo, no entanto, decorrente da rápida intensificação da substituição de vinhas na década de 90 do século XX, ocorreu também uma intensificação do sector viveirista, verificando-se a substituição desta pela introdução de enxertos-prontos no mercado.

Na mesma altura começa a verificar-se declínio e morte das vinhas jovens que originam avultados prejuízos, obrigando os viticultores a proceder a retanchas ou replantações das parcelas de vinha afectadas. Ao declínio das vinhas jovens estão associados maioritariamente fungos dos géneros *Ilyonectria* (anteriormente designados *Neonectria*, anamorfo *Cylindrocarpon*), responsáveis pelo pé-negro da videira e *Phaeomoniella* e *Phaeoacremonium*, causadores da doença de Petri. Também fungos da família Botryosphaeriaceae surgem frequentemente associados ao declínio e a outras doenças do lenho da videira (Phillips, 2002; Oliveira *et al.*, 2004; Rego *et al.*, 2006b).

O pé-negro da videira é ainda atribuído a fungos do género *Campylocarpon*, em regiões do Hemisfério Sul (Halleen *et al.*, 2004; Abreo *et al.*, 2010) e, eventualmente, a "*Cilindrocarpon*" *pauciseptatum*, apesar da patogenicidade de isolados desta espécie não ter sido inicialmente comprovada em videira (Schroers *et al.*, 2008; Alaniz *et al.*, 2009b).

Em Portugal, a doença do pé-negro da videira foi assinalada pela primeira vez na região do Oeste, associada a sintomas de declínio em videiras jovens e à morte dos porta-enxertos 99R e 110R, em vinhas do Alto Alentejo (Rego, 1994). Esta doença provoca sintomas característicos de necroses na zona basal da videira e estrias negras no xilema e foi atribuída, na época, a *Cylindrocarpon destructans* (teleomorfo *Neonectria radicola*). Mais tarde, grande parte dos isolados revelaram pertencer à espécie *C. liriodendri* (teleomorfo *Neonectria liriodendri*) (Halleen *et al.*, 2006b) e também a *C. macrodidymum* (teleomorfo *Neonectria macrodidyma*) (Rego *et al.*, 2005). Recentes revisões taxonómicas efectuadas para *Neonectria/Cylindrocarpon* conduziram ao enquadramento do teleomorfo destas espécies que atacam videira no género *Ilyonectria* (Chaverri *et al.*, 2011) e ao surgimento de diversas espécies novas em *I. radicola* e *I. macrodidyma* (Cabral, *et al.*, 2011a, 2011b).

Por uma questão de simplificação, no presente trabalho adoptam-se as designações anteriores às recentes publicações de Cabral *et al.* (2011a, 2011b), i.e. *Ilyonectria liriodendri*, *Ilyonectria macrodidyma* e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*.

Ao nível do viveiro, o material de propagação vegetativa, nomeadamente porta-enxertos e enxertos-prontos, constituem um importante veículo de disseminação de *Ilyonectria* spp. (Rego *et al.*, 2001a; Fourie & Halleen, 2003; Gubler *et al.*, 2004), sendo as contaminações do material vegetal atribuídas principalmente a inóculo existente no solo de viveiro (Rego *et al.*, 2001a; Halleen & Crous, 2001). As feridas do material vegetal, causadas durante o processo de produção de enxertos-prontos de videira, nas fases de preparação das estacas, enxertia, armazenamento e transporte, constituem factores que favorecem a susceptibilidade das plantas à penetração do(s) agente(s) patogénico(s).

Uma vez que os materiais produzidos em viveiro constituem um veículo de rápida propagação de agentes patogénicos é importante que se proceda ao controlo sanitário dos materiais de propagação vegetativa. Medidas como o tratamento com água quente ou a imersão das estacas de porta-enxertos em agentes de natureza química (fungicidas ou desinfectantes) e/ou biológica são recomendadas de forma a minimizar a infecção dos materiais de propagação (Fourie & Halleen, 2004b; Rego, 2004, Rego *et al.*, 2006a). A recente legislação que impede a plantação de viveiros para a produção de bacelos e enxertos-prontos durante 3 anos consecutivos representa também uma contribuição positiva para a diminuição das infecções por *Ilyonectria* (alínea a) do n.º8, artigo 13º, do DL n.º 194/2006 de 27 de Setembro).

O aparecimento da doença em viveiros dificulta a selecção de material vegetativo são. Apesar da utilização de enxertos-prontos para a instalação de vinhas ter levado à necessidade de obtenção de material de qualidade e certificado, a legislação europeia respeitante à produção e distribuição de material certificado não inclui ainda fungos do género *Ilyonectria* nem nenhum dos outros fungos envolvidos no declínio das vinhas jovens. Este facto verifica-se não só pela inexistência até ao momento de meios de luta eficazes no combate aos diferentes agentes causais, como pela falta de técnicas de detecção optimizadas e expeditas, decorrente do difícil diagnóstico da doença (Oliveira *et al.*, 2007).

A detecção de fungos *Ilyonectria* spp. por métodos de isolamento tradicionais torna-se difícil e morosa. Por esta razão, houve necessidade de se desenvolverem técnicas de diagnóstico mais sensíveis, nomeadamente biomoleculares como "nested-PCR" (Hamelin *et al.*, 1996; Nascimento *et al.*, 2001; Damm & Fourie, 2005; Alaniz *et al.*, 2009a; Mostert *et al.*, 2010) e PCR quantitativo (qPCR) (Probst, 2010) para a sua detecção.

O objectivo do presente estudo consistiu em identificar diferentes fontes de inóculo de fungos do género *Ilyonectria* durante as diversas fases do processo de produção de enxertos-prontos de videira em viveiro vitícola. Para tal, foram optimizadas técnicas biomoleculares, nomeadamente "nested-PCR" e Multiplex nested-PCR e técnicas

tradicionais da micologia na detecção dos agentes causais do pé.negro da videira em diferentes tipos de amostras: solo, materiais de propagação vegetativa de videira, substrato usado na estratificação, lâminas de corte, parafina, água dos tanques de hidratação e ar de diversos locais de armazenamento.

1.2. A actividade viveirista em Portugal

1.2.1. História dos viveiros

O surgimento de viveiros vitícolas adveio da necessidade de utilizar porta-enxertos resistentes à filoxera, no entanto a enxertia como técnica vitivinícola, é referenciada ainda antes do aparecimento da filoxera em Portugal, na década de 1860, sendo utilizada na altura como forma de corrigir o vigor da videira ou mesmo como meio de substituição de castas (Gyrão, 1822).

Após a invasão da filoxera em Portugal, a plantação de novas vinhas passou a realizar-se por instalação de porta-enxertos no local definitivo, efectuando-se no ano seguinte a enxertia no local, com recurso a garfos da casta de *Vitis vinifera* desejada. Esta técnica continuou a ser utilizada no período que antecedeu a entrada de Portugal na Comunidade Económica Europeia (CEE), durante o qual o sector viveirista não se encontrava organizado.

Foram muitas as empresas que, durante o século XX, surgiram nesta actividade, das quais a maioria com sede na região de Pó/Bombarral, local de excelentes condições edafo-climáticas para o desenvolvimento de viveiros de bacelo barbado (Peixe & Böhm, 2007).

Nos finais da década de 80, até meados dos anos 90 do século XX, recorreu-se à enxertia como forma de substituir castas brancas em plena produção, por castas tintas, devido a uma produção de vinhos brancos muito superior à procura. Neste caso foi utilizada a enxertia de gomo destacado, efectuada directamente sobre o tronco de plantas em plena produção (Peixe & Böhm, 2007).

Ainda nessa época, devido ao aumento do preço da mão-de-obra, aumento significativo das áreas a plantar e redução de mão-de-obra especializada em enxertia, surgem no mercado os enxertos-prontos como forma de substituição da técnica de enxertia no local (Peixe & Böhm, 2007). A utilização de enxertos-prontos oferece algumas vantagens relativamente à enxertia no local, nomeadamente um calo de cicatrização mais completo e robusto resultante da melhor justaposição dos tecidos do câmbio de ambos os biontes, proporcionado pelo tipo enxertia utilizado com recurso a máquinas especializadas; maior homogeneidade de plantação e de desenvolvimento; redução dos trabalhos de manutenção

para remoção de ladrões oriundos do cavalo; troncos mais erectos e bem orientados na vertical (Magalhães, 2008).

Também os planos de reestruturação e reconversão da vinha nacional verificados na década de 90 em Portugal levaram à intensificação da produção de enxertos-prontos, aumentando as trocas comerciais no país e com o exterior (Rego, 2004).

O aparecimento dos enxertos-prontos alterou significativamente a forma de plantar vinha, na medida em que contribuiu para a consciencialização da importância da rega na manutenção da capacidade produtiva da planta e para o aparecimento de máquinas de plantação adaptadas a este tipo de plantas. (Peixe & Böhm, 2007).

Em 1984 foi criada a VITICERT (Associação Nacional de Viveirista Vitícolas Produtores de Material Certificado) com o objectivo de divulgação do material de categoria certificada e representação dos interesses da classe viveirista junto das entidades oficiais. Dois anos depois, em colaboração com a autoridade sanitária, é elaborado um regulamento interno, com base nas regras comunitárias relativas à certificação de plantas vitícolas incrementando-se a instalação de vinhas-mãe com material importado e controlo de viveiros. A actual Direcção-Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR), inicialmente designada por Centro Nacional de Protecção da Produção Agrícola (CNPPA) e mais tarde por Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC), é responsável pelo processo de certificação de materiais em viveiro vitícola, identificando-se os materiais destinados à comercialização com etiquetas emitidas e distribuídas pela VITICERT, sob supervisão oficial. Este modelo entrou em funcionamento com a transposição das normas comunitárias relativas à comercialização de materiais de propagação vegetativa de videira para o direito nacional no ano de 1991 (Andrade *et al.*, 2007).

1.2.2. Produção de enxertos-prontos

Os fundamentos do processo de propagação de videira são semelhantes em todas as áreas de produção de videiras a nível mundial (Gramaje, 2011). As técnicas tradicionais de propagação de videiras utilizam estacas de porta-enxertos e de castas (garfos), provenientes de vinhas-mãe, as quais são depois enxertadas e enraizadas (Fig. 1.1). Algumas práticas como a hidratação, condições de armazenamento em frio e padrões gerais de higiene em viveiro, que têm um efeito significativo na qualidade do material produzido, podem variar consideravelmente de viveiro para viveiro (Gramaje, 2011).

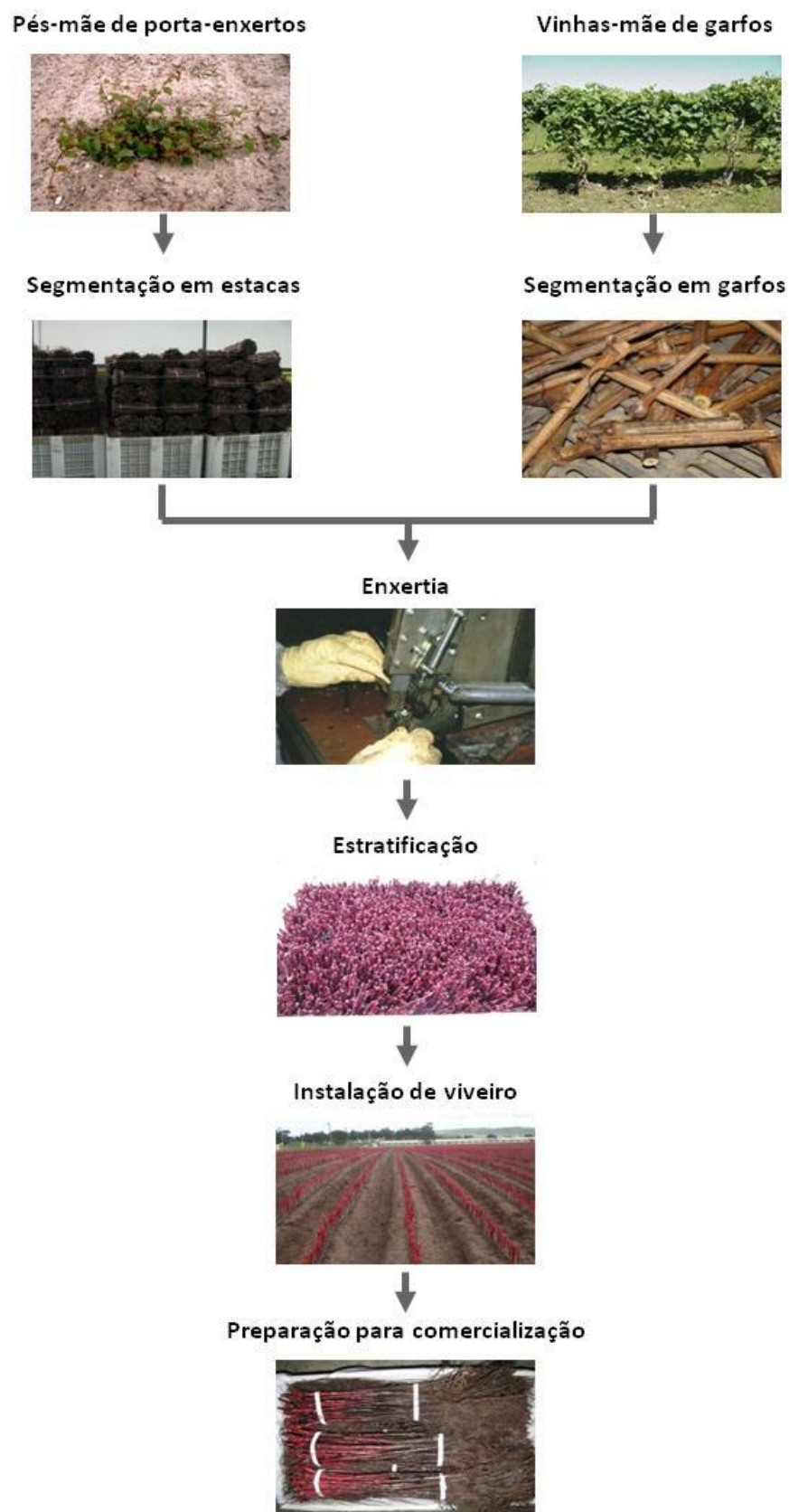


Fig. 1.1. Esquematização do processo de produção de enxertos-prontos de videira em viveiro vitícola.

A produção de enxertos-prontos inicia-se com a recolha de varas de porta-enxertos provenientes dos pés-mãe, em Portugal, entre Novembro e Fevereiro. Estas plantas provêm de bacelos enraizados de categoria "base" e têm de estar normalmente plantadas em parcelas que não tenham tido vinha instalada há pelo menos 12 anos ou 6 anos, no caso de se proceder à desinfecção do solo (alíneas a) e b) do n.º 6, artigo 13º, do DL n.º 194/2006, de 27 de Setembro). São normalmente conduzidas em cabeça de salgueiro, podendo também ser conduzidas em paliçada. Este último sistema de condução é praticado em regiões setentrionais da Europa e em outras zonas de clima fresco. Por implicar elevados custos de implementação e manutenção não é praticado em Portugal, com excepção de situações pontuais na Região de Entre Douro e Minho (Magalhães, 2008).

Após o corte das varas estas seguem para armazém com o fim de serem segmentadas em estacas de 30 cm de comprimento a partir do gomo basal ou 20 cm se forem destinadas à Sicília, Itália (alínea b) do n.º 6, artigo 13º, do DL n.º 194/2006, de 27 de Setembro). Procede-se depois à remoção dos gomos de modo a evitar o seu abrolhamento, favorecendo desta forma a ligação entre o porta-enxerto e casta.

Desde a preparação até à enxertia, as estacas são conservadas em câmaras frigoríficas a uma temperatura entre os 2 °C e 4 °C e humidade relativa de aproximadamente 90%.

A recolha de material vegetal para garfos é efectuada durante o período de poda de vinha. Este material provém de vinhas-mãe instaladas com o objectivo de produção de garfos. Estas vinhas são sujeitas a acções de controlo por parte das direcções regionais de agricultura sob orientação da DGADR (n.º 2, artigo 4º, do DL n.º 194/2006, de 27 de Setembro). Este material é recolhido em molhos de 100 varas, possuindo cada uma, um total de 10 gomos devidamente etiquetados e armazenados em câmaras frigoríficas nas condições referidas anteriormente. Posteriormente, cada vara é segmentada em garfos contendo apenas um gomo. A distância do corte abaixo do gomo é normalmente superior de modo a permitir a execução da enxertia no seu meritalo.

Após a segmentação de todo o material vegetal procede-se à sua hidratação e desinfecção com fungicida, prática que varia, dependendo do país e do viveiro. Exemplo disso é a prática de imersão dos porta-enxertos em água e fungicidas antes do armazenamento em frio que não é comum em países como Chile (Aguirre *et al.*, 2001), França (Anónimo, 2005) e Espanha (Hidalgo, 2002; Aroca *et al.*, 2010).

O processo de enxertia inicia-se, em Portugal, no final do mês de Fevereiro, através da enxertia de mesa. Esta técnica de enxertia é a mais utilizada em todo o mundo, sendo a mais adequada para a produção em massa de enxertos-prontos. A enxertia é efectuada por máquinas apropriadas que permitem o encaixe rápido e eficaz, através do corte simétrico

em ambos os biontes, consistindo na junção do garfo e porta-enxerto. A estaca e garfo escolhidos para o encaixe devem ser de calibre semelhante e o diâmetro do garfo nunca deve ser superior ao da estaca. Existem vários tipos de fendas efectuados por máquinas, nomeadamente a fenda inglesa, fenda de encaixe múltiplo e fenda em ómega, sendo esta última a mais utilizada. Posteriormente, procede-se à parafinação da zona de encaixe, que consiste em mergulhar parcialmente o material vegetal numa tina de parafina fundida a 65°C, passando depois por água fria de modo a formar uma camada protectora solidificada. A maioria das parafinas utilizadas contém hormonas indutoras de calogénese, assim como, fungicida que inibe a contaminação por fungos (Nicholas *et al.*, 2001; Hidalgo, 2002; Magalhães, 2008).

Segue-se a fase de estratificação, na qual as plantas, sob condições de calor e humidade formam um calo em volta da região de enxertia (Winkler *et al.*, 1974; Hartmann *et al.*, 2001). A temperatura, humidade e meio de estratificação podem variar conforme os viveiros. Em viveiros em Itália utiliza-se como substrato aparas de madeira e as plantas permanecem sob condições variáveis de temperatura (20°C a 32°C), com humidade relativa da ordem dos 75% a 90%, durante 2 semanas (Zanzotto *et al.*, 2008). Na África do Sul, as estacas enxertadas à mão são estratificadas a cerca de 18°C durante um período de 5 semanas, enquanto as estacas enxertadas com recurso a máquinas são estratificadas entre 26°C e 28°C e 70% de humidade relativa durante um período de até 3 semanas, seguido por um período de endurecimento de 1 a 2 semanas sob redes de sombra (Fourie & Halleen, 2006). O meio de estratificação utilizado na África do Sul consiste em aparas de pinheiro, humedecidas em fungicida de largo espectro (Retief *et al.*, 2006). Em Espanha, as plantas enxertadas são colocadas em caixas de plástico com 10 cm de turfa e armazenadas entre 24°C-26°C e 80% de humidade relativa durante 16 a 20 dias (Hidalgo, 2002; Aroca *et al.*, 2010). Nos viveiros Australianos são utilizadas maioritariamente caixas de estratificação contendo vermiculite e a estratificação é realizada à temperatura de 28°C-29°C durante 2 semanas (Nicholas *et al.*, 2001). No Chile, as estacas enxertadas são estratificadas a 20°C-25°C e humidade relativa de 85% a 90% durante 25 a 30 dias (Aguirre *et al.*, 2001).

Nos viveiros da América do Norte, a estratificação ocorre em caixas contendo turfa, maravalha ou aparas de madeira, entre 24°C-29°C durante 10 dias a 2 semanas (Winkler, 1974; Weaver, 1876). Nesta fase, as estacas enxertadas são colocadas em caixas de madeira ou de plástico.

Em Portugal, a técnica mais utilizada actualmente consiste em colocar uma camada de 5 a 10 cm de turfa humedecida no fundo da caixa de estratificação, onde são colocadas depois as estacas enxertadas, segundo o seu pólo basal. Outra técnica semelhante à anterior

consiste na estratificação em água, em que a camada de turfa na base é substituída por água.

As caixas seguem posteriormente para câmaras a uma temperatura de 30-32°C e humidade relativa de 90% onde permanecem durante 10 a 12 dias para que ocorra o desenvolvimento do calo de enxertia. Após a formação do calo, as caixas de estratificação são colocadas à temperatura ambiente durante uma semana, para que as plantas se adaptem gradualmente às condições de campo (Magalhães, 2008).

Antes da plantação, em viveiro, retiram-se as plantas enxertadas das caixas, sendo depois novamente parafinadas com o objectivo de reforçar a película de protecção na zona de enxertia de forma a conferir resistência suficiente às condições atmosféricas no viveiro (Magalhães, 2008).

Seguidamente, as plantas são levadas para viveiro em ar livre cujo solo foi previamente mobilizado e desinfectado com produto autorizado. De acordo com o n.º8, artigo 13º, do DL n.º 194/2006, os terrenos a utilizar para a instalação de viveiro não devem ter sido cultivados com videiras no mínimo há três anos.

A plantação pode ser efectuada de várias formas, variando de viveirista para viveirista. A mais usual consiste em dispor as plantas em linha num terreno à rasa, outra consiste em armar o terreno em camalhões mais ou menos largos consoante a colocação de duas ou uma linha respectivamente. Pode ainda ser feita a cobertura das linhas com polietileno, de forma a promover um melhor enraizamento pelo aumento da temperatura do solo, reduzir as perdas de água e, simultaneamente, facilitar o controlo de infestantes (Nicholas *et al.*, 2001; Hidalgo, 2002; Jackson, 2008). Esta técnica pode, no entanto, tornar-se desfavorável, ao conduzir a um sobreaquecimento do solo afectando a rizogénese e o bom desenvolvimento das raízes (Magalhães, 2008). Num viveiro da África do Sul verificou-se que a cobertura de plástico não originava efeitos aparentes no desempenho das plantas (Hunter *et al.*, 2004).

Durante a permanência das plantas em viveiro, são necessários trabalhos de manutenção, nomeadamente rega, adubações e tratamentos fitossanitários, nomeadamente contra míldio, oídio e, eventualmente, cicadelídeos. Durante o ciclo vegetativo, o viveirista tem de combater infestantes, quando necessário, através da sua destruição manual ou utilizando herbicidas.

Quando os enxertos-prontos atingem um desenvolvimento muito vigoroso há que proceder a um, dois ou vários cortes, para que as plantas não entrem em competição pela luminosidade. As plantas vão permanecer no viveiro até ao Outono/Inverno, altura em que entram na fase de dormência. O arranque dos enxertos prontos já enraizados é efectuado através de alfaias apropriadas.

Depois do arranque das plantas do viveiro, procede-se à sua selecção, poda da parte aérea e corte das raízes. Posteriormente são parafinadas, agrupadas em molhos de 25, 50 ou 100 unidades, devidamente etiquetadas e conservadas em câmaras frigoríficas a temperaturas entre 2 °C e 4 °C, até à sua comercialização. A etiquetagem do material é efectuada segundo as diversas categorias de certificação, dependentes da maior ou menor garantia do seu estado sanitário, relativamente a agentes patogénicos diversos (vírus, viróides, fitoplasmas).

Quando comercializados, os enxertos-prontos são colocados em sacos de plástico, dentro de caixas de cartão, para evitar perdas de humidade, proteger de choques e facilitar o transporte.

1.2.3. Principais fungos do lenho que afectam os materiais vitícolas

A maioria dos fungos do lenho da videira infecta o material de propagação vegetativa e vinhas jovens. Estes têm sido assinalados na maioria das regiões vitícolas mundiais, individualmente ou associados, sendo responsáveis pelo declínio, perdas de produtividade e morte das videiras jovens. Como consequência, muitos viticultores têm sido forçados a replantar as suas vinhas devido aos prejuízos decorrentes da gestão das vinhas fracas e pouco desenvolvidas serem superiores aos custos de replantação (Oliveira *et al.*, 1998; Scheck *et al.*, 1998b; Fourie & Halleen, 2001a).

De entre os fungos associados ao declínio das vinhas jovens destacam-se *Phaeomoniella chlamydospora* e inúmeras espécies do género *Phaeoacremonium*, responsáveis pela doença de Petri, também conhecida como "esca das vinhas jovens", "declínio das vinhas jovens" ou "black goo", fungos dos géneros *Ilyonectria* e *Campylocarpon*, responsáveis pela doença do pé-negro da videira, "*C.*" *pauciseptatum* e fungos da família Botryosphaeriaceae (Rego *et al.* 2000; Halleen *et al.*, 2003; Giménez-Jaime *et al.*, 2006; Halleen *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2006b; van Niekerk *et al.*, 2006; Schroers *et al.*, 2008; Vaz, 2008; Alaniz *et al.*, 2009b).

Existem ainda fungos que causam o depauperamento e quebra de rendimento das plantas atacadas, manifestando-se tanto em vinhas jovens como em vinhas adultas, como é o caso de *Phomopsis viticola*, responsável pela escoriose americana. Outros fungos como *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. são também frequentemente isolados (Fourie *et al.*, 2000; Halleen & Crous, 2001; Edwards & Pascoe, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Oliveira & Rego, 2007).

Resultados de estudos levados a cabo em Portugal indicam que, relativamente ao declínio das videiras jovens, existe uma comunidade de fungos já instalada nos diferentes materiais vitícolas de viveiro (porta-enxertos e garfos) dando resultado a plantas dificilmente saudáveis (Rego *et al.*, 2001a; Rego, 2004; Pinto *et al.*, 2005).

As plantas-mãe de porta-enxertos são muito susceptíveis a fungos Botryosphaeriaceae e *Phomopsis* (Oliveira *et al.*, 2007). Estudos realizados em Portugal verificaram a forte colonização de varas de porta-enxertos por estes fungos (Rego *et al.*, 2001a; Pinto *et al.*, 2005) e em menor quantidade por fungos *Ilyonectria* spp. (Rego *et al.*, 2001a). Resultados semelhantes foram obtidos em viveiros em Espanha (Giménez-Jaime, 2006). Na África do Sul, foi demonstrado que *Pa. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp. e *Ilyonectria* spp. já estavam presentes em material de propagação aparentemente saudável antes da plantação em viveiro (Halleen *et al.*, 2003) e em pés-mãe de porta-enxertos (Fourie & Halleen, 2004a). Ao efectuar a análise de plantas-mãe do porta-enxerto 1103P, em toda a sua extensão, Pinto *et al.* (2005) verificaram a predominância de *Ilyonectria* spp., fungos Botryosphaeriaceae, *Pa. chlamydospora*, *Phomopsis* spp. e *Fusarium* spp. ao nível do tronco, no entanto, *Ilyonectria* spp. e *Pa. chlamydospora* não foram detectados nas varas do ano. A elevada incidência e severidade de *Phomopsis* spp. e Botryosphaeriaceae verificada ao nível das varas afectam significativamente a qualidade sanitária das estacas contribuindo para o aumento da susceptibilidade das mesmas a infecções causadas por *Ilyonectria* spp. e/ou *Pa. chlamydospora*, que ocorrem principalmente no período de enraizamento em viveiro vitícola. Quanto a *Pa. chlamydospora* é também possível que este fungo contamine o material vegetal através de esporos disseminados por via aérea no campo, ou nas várias etapas de preparação das estacas e da enxertia (Oliveira *et al.*, 2007).

Ao nível dos enxertos-prontos são frequentemente isolados os fungos *Pa. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp., *Ilyonectria* spp. e Botryosphaeriaceae (Oliveira *et al.*, 2007; Zanzotto *et al.*, 2001; Giménez-Jaime *et al.*, 2006). Espécies da família Botryosphaeriaceae têm sido frequentemente isoladas em viveiros, a partir da zona de enxertia mal sucedida (Phillips, 2002; Gramaje *et al.*, 2009b; Billones *et al.*, 2009; 2010).

1.3. A doença do pé negro da videira

1.3.1. Agentes causais

O pé-negro da videira é uma das principais doenças do lenho associada ao declínio das vinhas jovens, afectando maioritariamente videiras entre os dois e os oito anos de idade (Sweetingham, 1983; Larignon, 1999; Fourie & Halleen, 2001b). A esta doença estão amplamente associados pelo menos quatro agentes causais, nomeadamente *Ilyonectria liriodendri*, *Ilyonectria macrodidyma* (Halleen *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2006b), *Campylocarpon fasciculare* e *Campylocarpon pseudofasciculare* (Halleen *et al.*, 2004). De entre estes, *I. liriodendri* e *I. macrodidyma* são os mais frequentemente isolados (Petit & Gubler, 2005; Halleen *et al.*, 2006b; Alaniz *et al.*, 2007; Reis, 2010). Outras espécies do género *Ilyonectria*, também associadas ao pé-negro da videira, foram muito recentemente descritas pela primeira vez por Cabral *et al.* (2011a, 2011b). Algumas dessas espécies enquadravam-se anteriormente no complexo "*C. destructans*", nomeadamente *I. europaea*, *I. lusitanica*, *I. pseudodestructans*, *I. robusta* (Cabral *et al.*, 2011a), outras em *I. macrodidyma*, como sejam *I. estremocensis*, *I. alcacerensis*, *I. novozelandica* e *I. torresensis* (Cabral *et al.*, 2011b).

Espécies do género *Campylocarpon* foram até à data apenas assinaladas na África do Sul (Halleen *et al.*, 2004) e Uruguai (Abreo *et al.*, 2010). Alguns estudos de patogenicidade revelaram que quer *Ilyonectria* spp. quer *Campylocarpon* spp. provocavam sintomas idênticos em videira, não havendo diferenças de virulência entre eles (Halleen *et al.*, 2004; Petit & Gubler, 2005; Alaniz *et al.*, 2007). Posteriormente, Alaniz *et al.* (2009b) detectaram diversidade em *I. macrodidyma*, através de ISSR ("Inter-simple sequence repeat"), verificando ainda que alguns grupos de *I. macrodidyma* mostravam ser mais virulentos do que *I. liriodendri*. Esta diversidade foi comprovada por Cabral *et al.* (2011b), tal como referido anteriormente, tendo possibilitado a diferenciação de quatro novas espécies anteriormente referidas como *I. macrodidyma*.

Também recentemente foi descrita "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*, uma nova espécie "*Cylindrocarpon*-like", associada a raízes de videira na Nova Zelândia e Eslovénia (Schroers *et al.*, 2008). A revisão taxonómica desta espécie está actualmente em curso. Desde então, "*C.*" *pauciseptatum* tem sido assinalada em países como o Uruguai (Abreo, 2010), Espanha (Martín *et al.*, 2011) e Portugal (Cabral *et al.*, 2011a) e a sua patogenicidade foi confirmada experimentalmente para o porta-enxerto 110R (Alaniz *et al.*, 2009b), estando o seu papel como agente causal do pé-negro da videira ainda por confirmar.

Verifica-se, assim, que uma doença originalmente atribuída a *Cylindrocarpon destructans* (e também a *C. obtusisporum*) tem actualmente associados inúmeros agentes causais, alguns descritos pela primeira vez a nível mundial muito recentemente. A importância relativa de cada um deles na doença está ainda por esclarecer.

1.3.2. Bioecologia

Os fungos do género *Ilyonectria* são cosmopolitas, habitam no solo e na rizosfera, onde ocorrem como saprófitas em detritos vegetais, ou como patogénicos infectando uma vasta gama de hospedeiros onde originam necroses e podridão de raízes (Brayford, 1993; Halleen *et al.*, 2004; Chaverri *et al.*, 2011). Os clamidósporos, esporos de resistência de parede celular espessa, são normalmente diferenciados por estes fungos nos tecidos vegetais e nos órgãos atacados da planta, possivelmente como uma adaptação para a sobrevivência no solo (Chaverri *et al.*, 2011). Podem ainda sobreviver durante extensos períodos de tempo sob a forma de micélio hibernante nos órgãos atacados, ou como saprófita no solo (Matturi & Stenton, 1964; Booth, 1966; Grasso, 1984; Halleen *et al.*, 2004). No entanto, a informação actualmente disponível sobre a sobrevivência destes patogénios e o papel que os clamidósporos desempenham nas infecções é ainda escassa. Por analogia com outros fungos, teme-se que o poder de sobrevivência seja elevado, uma vez que clamidósporos de fungos do género *Cylindrocladium*, semelhantes a *Cylindrocarpon* (*Ilyonectria*), permanecem viáveis até 15 anos (Crous, 2002).

Não são normalmente encontradas peritecas em *Ilyonectria*, mas estas, quando existentes, estão normalmente associadas a substratos herbáceos (Chaverri *et al.*, 2011).

Em viveiros vitícolas, as principais contaminações por *Ilyonectria* spp. ocorrem a partir de inóculo existente no solo, infectando as plantas através das raízes e da base dos porta-enxertos (Halleen *et al.*, 2003). Estudos realizados em viveiros em Portugal e na África do Sul demonstraram que, na altura da plantação (Outubro), havia um número reduzido de plantas infectadas, enquanto que, na altura do arranque (Junho), se verificava uma incidência de *Ilyonectria* spp. de 37% e de 50%, respectivamente (Rego *et al.*, 2001a; Halleen & Crous, 2001). Estudos como estes comprovam que o material de propagação, após o enraizamento, é também um importante veículo de disseminação do patogénio (Rego *et al.*, 2001a; Fourie & Halleen, 2003; Gubler *et al.*, 2004).

O papel dos pés-mãe de porta-enxertos como fonte primária de fungos do lenho da videira tem sido documentado por muitos autores, contudo o papel das vinhas-mãe de garfos está menos bem definido, havendo resultados contraditórios quanto à sua contribuição para as

doenças que afectam os viveiros e vinhas jovens (Bertelli *et al.*, 1998; Pascoe & Contral, 2000; Edwards *et al.*, 2001; Sidoti *et al.*, 2000; Zanzotto *et al.*, 2001; Halleen *et al.*, 2003; Aroca & Raposo, 2005).

Estudos realizados em Portugal e na África do Sul revelaram baixos níveis de *Ilyonectria* spp. em estacas de pés-de mãe de porta-enxertos embora estivessem fortemente colonizadas por outros fungos do lenho, como *Botryosphaeriaceae* e *Phomopsis viticola* (Rego *et al.*, 2001a; Fourie & Halleen, 2002b). Também em estacas enxertadas estratificadas antes da plantação em viveiros na África do Sul, se verificou uma incidência reduzida de *Ilyonectria* spp. (Halleen *et al.*, 2003).

Fungos do género *Ilyonectria* têm sido isolados a partir das raízes, do porta-enxerto e da região de enxertia, após o enraizamento em solo de viveiro. Na altura da plantação a infecção ocorrerá a partir das raízes, ou da zona basal do porta-enxerto, que se encontra parcial ou totalmente exposta à infecção por patógenos do solo. A zona basal da estaca, a partir da qual emergem as raízes parte-se frequentemente durante o processo de plantação, resultando em pequenas feridas susceptíveis de sofrer infecção (Rego *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2003; Halleen *et al.*, 2007). Além disso, a base de estaca é também, por si só, uma zona vulnerável.

Na África do Sul, as infecções verificadas ao nível da região da enxertia são atribuídas ao envolvimento temporário dessa zona com solo, com o objectivo de manter a humidade e evitar a dessecação dos tecidos de cicatrização (Halleen *et al.*, 2003). Em Portugal, os fungos *Ilyonectria* spp. são também isolados da região de enxertia, apesar desta prática ser actualmente pouco utilizada em Portugal. Apenas se pratica, com objectivos idênticos em vinhas plantadas com bacelos e enxertadas no local (H. Oliveira, comunicação pessoal).

Prospecções efectuadas em viveiros e cooperativas agrícolas em Espanha verificaram a presença de *Ilyonectria* spp. em plantas enxertadas e porta-enxertos enraizados, prontos para a instalação no campo (Aroca *et al.*, 2006). Também Gramaje *et al.* (2009c) têm isolado espécies de *Ilyonectria* a partir de plantas de viveiro em Espanha. Situação idêntica já havia sido reportada em inúmeros países, entre outros, Itália (Grasso & Magnano di San Lio, 1975), França (Maluta & Larignon, 1991), EUA (Scheck *et al.*, 1998a), Grécia (Rumbos e Rumbou, 2001), Austrália (Edwards & Pascoe, 2004), Nova Zelândia (Jaspers, 2007).

Não se conhece ainda com exactidão o ciclo do pé-negro da videira. Supõe-se que, a partir do solo, o fungo penetre no porta-enxerto quer pela base das estacas e raízes quer por feridas, progredindo de forma relativamente rápida nos tecidos do hospedeiro, provocando uma necrose característica no lenho, de cor castanha a negra (Dubos, 1999;

Rego *et al.*, 2000; Gubler *et al.*, 2004). A ocorrência de infecções secundárias não está comprovada para esta doença.

Factores ambientais e o stresse do hospedeiro, causado pela deficiência em nutrientes, má drenagem, compactação do solo, carga elevada em plantas jovens, plantação de vinhas em solos mal preparados e má condução das plantas, contribuem para o desenvolvimento da doença do pé-negro da videira (Larignon, 1999; Fourie *et al.*, 2000; Fourie & Halleen, 2001b; Halleen *et al.*, 2004).

A compactação do solo e/ou a má preparação do mesmo contribuem para um fraco desenvolvimento das raízes (Fourie *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2004), o que constitui um factor de maior susceptibilidade das videiras à doença.

As altas temperaturas durante o período de Verão também contribuem para a expressão de sintomas, na medida em que levam a que os sistemas radicular e vascular das plantas doentes não consigam fornecer água suficiente para compensar as elevadas taxas de evapotranspiração que se fazem sentir quando as temperaturas são mais elevadas (Larignon, 1999).

O tipo de solo e as suas características têm influência na população de fungos e de outros microorganismos na rizosfera. Um estudo realizado por Peterson (1958) demonstrou que em solos arenosos ácidos as espécies de *Fusarium* spp. eram predominantes na superfície das raízes, comparativamente a espécies de *Ilyonectria*, que se encontravam praticamente ausentes. Contrariamente, em solos calcários alcalinos as espécies de *Ilyonectria* eram mais abundantes, verificando-se uma presença escassa de *Fusarium* spp. Para solos argilosos neutros, a proporção dos dois géneros de fungos manifestou-se de forma idêntica.

Recentemente, foi demonstrado que as infestantes podem ser potenciais hospedeiros de patógenos causadores do pé-negro da videira (Agustí-Brisach, 2011), favorecendo a multiplicação e sobrevivência de inóculo em parcelas não cultivadas.

Na Austrália, um estudo realizado com videiras envasadas demonstrou que sob condições de stresse hídrico, a aplicação ao solo de 0,36 kg.ha⁻¹ de substância activa de glifosato aumenta a severidade dos sintomas da doença. Na fase inicial, verificou-se que em videiras doentes, onde foi aplicado glifosato, o crescimento do caule foi diminuído em 89% comparado com videiras doentes onde não foi efectuada a aplicação de herbicida (Whitelaw-Weckert, 2010).

1.3.3. Sintomas da doença

A doença do pé-negro da videira manifesta sintomas em vinhas-mãe, bachelos, enxertos-prontos e vinhas enxertadas (Rego, 2004), sendo estes idênticos independentemente da espécie de *Ilyonectria* presente (Scheck *et al.*, 1998b; Halleen *et al.*, 2004; Petit & Gubler, 2005; Alaniz *et al.*, 2007).

Os principais sintomas de pé-negro da videira, observados em plantas de viveiro (Fig. 1.2), são coloração negra dos tecidos do lenho e gomas inclusas nos vasos xilêmicos dos porta-enxertos afectados e estrias negras nos tecidos vasculares (Grasso & Magnano Di San Lio, 1975; Scheck *et al.*, 1998a). Durante o período de enraizamento das estacas em viveiro normalmente não se observam sintomas na parte aérea das plantas (Rego *et al.*, 2001a; Halleen *et al.*, 2003). É no entanto visível um número variável de plantas mortas que terão sucumbido no início do processo de enraizamento e das quais são isolados com frequência fungos do género *Ilyonectria* a partir das raízes, ou da base do porta-enxerto (H. Oliveira, comunicação pessoal).

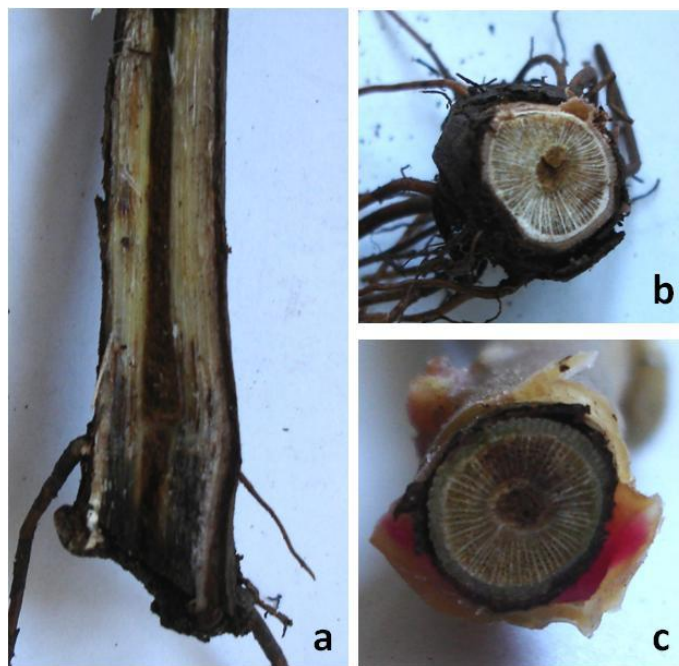


Fig. 1.2. Sintomas associados ao pé-negro da videira em viveiro vitícola: a) corte longitudinal da base de porta-enxerto infectado com necrose na região basal; b) corte transversal da zona da base de porta-enxerto com sintomas; c) corte transversal da zona de enxertia evidenciando necrose.

Na vinha, as videiras afectadas manifestam redução de vigor, entrenós curtos, redução do número e do tamanho das folhas, cloroses e necroses entre as nervuras (Grasso & Magnano Di San Lio, 1975; Grasso, 1984; Maluta & Larignon, 1991; Scheck *et al.*, 1998a; Rego *et al.*, 2000). Ao nível radicular, os sintomas característicos de

vinhas afectadas por *Ilyonectria* spp. consistem em necroses nas raízes e redução da biomassa radicular (Halleen *et al.*, 2006a; Alaniz *et al.*, 2007). Por vezes, pode ocorrer o desprendimento do ritidoma radicular (Rego, 2004). De forma a compensar a perda de biomassa radicular, as plantas emitem, com frequência, novas raízes num nível superior do porta-enxerto, perto da superfície do solo (Larignon, 1999).

A remoção do ritidoma revela uma necrose acastanhada na região basal do porta-enxerto, podendo esta necrose estender-se ao longo de todo o porta-enxerto, atingindo a região da enxertia. O corte transversal efectuado ao longo da planta revela o desenvolvimento de necroses nos tecidos corticais, que podem ser de tipo pontuações ou anel contínuo, na base do porta-enxerto e na zona da enxertia (Dubos, 1999; Larignon, 1999; Fourie & Halleen, 2001b; Rego, 2004).

Os pés-mãe de porta-enxertos podem também ser infectados por fungos do género *Ilyonectria*, afectando a qualidade das varas produzidas, podendo estar associados à morte da cepa. Estas exibem sintomas idênticos aos observados em plantas de viveiro ou em videiras enxertadas (Rego *et al.*, 2001a; Pinto *et al.*, 2005).

1.3.4. Meios de Luta

Embora o presente estudo não se relacione directamente com meios de luta, considerou-se relevante proceder à revisão da literatura sobre o assunto, dada a importância do mesmo para o sector vitivinícola, em geral.

O combate do pé-negro da videira deve ser realizado de forma preventiva (Rego, 1994; Dubos, 1999; Larignon, 1999; Martínéz *et al.*, 2004) devido à inexistência de meios de luta directos eficientes.

Durante os últimos anos, vários estudos têm-se focado no desenvolvimento de processos e na selecção de produtos químicos e outros para prevenir ou reduzir a infecção dos tecidos da videira, por fungos causadores do pé negro, incluindo o uso do tratamento com água quente (Halleen *et al.*, 2007; Bleach *et al.*, 2009; Gramaje *et al.*, 2010), controlo biológico (Halleen *et al.*, 2007), aplicação de fungicidas (Fourie & Halleen, 2006; Halleen *et al.*, 2007; Rego *et al.*, 2006a, 2009; Alaniz *et al.*, 2011), de biopesticidas (Nascimento *et al.*, 2007) e o uso de fungos micorrízicos arbusculares (Petit & Gubler, 2006) com resultados promissores.

1.3.4.1. Luta Cultural

Os viveiros vitícolas devem ser instalados em solo isento dos agentes causais do pé-negro, ou onde a doença não tenha sido diagnosticada (Rego, 1994). De forma a assegurar a sanidade das plantas é essencial o uso de solos sem historial recente de cultivo de vinha (Rego *et al.*, 2001a).

Durante o processo de propagação de videiras enxertadas em viveiro todos os utensílios utilizados devem ser desinfectados com frequência, aconselhando-se lixívia a 5% (Rego, 1994).

No que se refere à escolha do porta-enxerto, relativamente à sua sensibilidade ao pé-negro, alguns estudos revelam não haver diferença entre cultivares (Descottes *et al.*, 1991; Rego *et al.*, 2001b). No entanto, há referências de que os porta-enxertos *Vitis riparia* 036-16 e *Fredmon* apresentam um bom grau de resistência (Gubler *et al.*, 2004). Também um estudo recente efectuado em Espanha demonstrou que todos os porta-enxertos inoculados com *I. liriodendi* e *I. macrodidyma* foram afectados a vários níveis, sendo o porta-enxerto 110R o mais susceptível a ambos os patogénios (Alaniz *et al.*, 2010).

O material de propagação vegetativa utilizado na instalação de novas vinhas deve estar isento de fungos e ser cuidadosamente observado, de forma a serem detectadas possíveis infecções. Ao nível do porta-enxerto podem detectar-se preliminarmente contaminações através de observação de anomalias no desenvolvimento e coloração de raízes, nomeadamente enegrecidas. Devem realizar-se, por amostragem, cortes transversais na base do porta-enxerto procedendo-se à pesquisa de pontuações negras dispersas na região cortical do lenho (Rego, 1994). Os materiais com sintomas suspeitos devem ser analisados laboratorialmente (Rego, 2004).

1.3.4.2. Luta Biológica

A aplicação de *Trichoderma* spp. ao solo tem-se revelado um meio eficaz no aumento da resistência das plantas, especialmente quando estas estão sujeitas a condições de stresse. Em estudos realizados na África do Sul verificou-se uma diminuição em 42,9% de *Ilyonectria* spp. em isolamentos de raízes de videiras tratadas com *Trichoderma*, relativamente a videiras não tratadas. Os tratamentos com *Trichoderma* proporcionaram também um aumento significativo do desenvolvimento das raízes, tornando as plantas mais resistentes ao pé-negro da videira, quando sujeitas a condições de stresse (Fourie *et al.*, 2001). Vários estudos têm ainda demonstrado a eficácia de *Trichoderma* na protecção das feridas de poda, reduzindo a infecção destas por patogénios (Di Marco *et al.*, 2004;

Fourie & Halleen, 2005; Kotze *et al.*, 2009; Mutawila *et al.*, 2010). A imersão de estacas de porta-enxertos, antes da enxertia, em formulações de *Trichoderma* reduz também a incidência de *Pa. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* na zona basal e na zona da enxertia das plantas de viveiro (Fourie & Halleen, 2004b).

Glomus intraradices (fungo micorrízico) constitui também um meio de controlo da doença do pé-negro da videira, quando aplicado de forma preventiva (Petit & Gubler, 2006).

Num estudo realizado por Nascimento *et al.* (2007) verificou-se que a quitosana (polímero não tóxico, biocompatível e biodegradável), promoveu o crescimento vegetativo e o número total de raízes de videiras infectadas com *I. liriodendri*, reduzindo simultaneamente a incidência da doença, comparativamente com plantas testemunha. Neste estudo, a eficácia de quitosana contra *I. liriodendri* mostrou-se semelhante à eficácia alcançada por alguns fungicidas convencionais, nomeadamente carbendazime + fluzilazol, ciprodinil + fludioxonil e tebuconazol.

Estudos realizados na Nova Zelândia verificaram que a biofumigação do solo com mostarda (*Brassica juncea*) reduziu a incidência de *Ilyonectria* spp. em estacas plantadas em solo infectado. Em ensaios *in vitro* os resultados demonstraram que diferentes tratamentos biofumigantes originaram uma redução do crescimento micelial destes fungos, concluindo-se assim que a biofumigação com mostarda pode ser altamente eficaz na redução de inóculo de *Ilyonectria* no solo, assim como na redução da incidência da doença do pé-negro (Bleach *et al.*, 2010).

A percentagem de matéria orgânica poderá influenciar a presença do género *Ilyonectria* no solo. Solos com uma elevada percentagem de matéria orgânica possuem uma maior e mais diversa população microbiana, como actinomicetas e outras bactérias, capazes de produzir antibióticos, com capacidade para competir com os agentes patogénicos (Whitelaw-Weckert, 2004).

1.3.4.3. Luta Química

O controlo químico pode ser utilizado como estratégia para diminuir a incidência e severidade de *Ilyonectria* spp. e durante o processo de propagação de videiras, em viveiro (Alaniz *et al.*, 2011).

Rego *et al.* (2006a) provaram que os fungicidas benomil, tebuconazol, carbendazime + flusilazol e ciprodinil + fludioxonil, seleccionados de acordo com ensaios *in vitro*, diminuíram a incidência do pé-negro em videiras cujas raízes foram tratadas com estes fungicidas, antes da plantação (ensaio em vasos). Também Nascimento *et al.* (2007)

confirmaram que ciprodinil + fludioxonil reduziram a incidência de *I. liriodendri* e *Pa. chlamydospora* em ensaios com videiras envasadas.

Ensaios *in vitro*, realizados na África do Sul por Halleen *et al.* (2007) revelaram que benomil, fluzilazole, imazalil e procloraz foram eficientes na redução do crescimento micelial de *I. liriodendri* e *I. macrodidyma*, no entanto, apenas benomil e imazalil demonstraram alguns efeitos no controlo destes patógenos em ensaios de campo.

Recentemente Alaniz *et al.* (2011) avaliaram a eficácia de fungicidas contra *I. liriodendri* e *I. macrodidyma* em ensaios *in vitro*, verificando que carbendazime, sulfato de hidroxiquinolina, imazalil e procloraz eram os fungicidas mais eficazes na redução do crescimento micelial destes fungos e captana, oxicleto de cobre, cloreto de didecildimetilamonio e tirame eram os mais eficazes na inibição da germinação de conídios para ambas as espécies.

Ao testarem alguns fungicidas, Rego *et al.* (2009) e Vignes *et al.* (2010) concluíram que, a imersão de material de propagação infectado, antes da enxertia, numa mistura de ciprodinil + fludioxonil ou piraclostrobina + metirame reduzia a presença de *Ilyonectria*, *Pa. chlamydospora* e Botryosphaeriaceae.

Alaniz *et al.* (2011) conduziram um ensaio em vaso com vários fungicidas de forma a determinar o seu potencial em prevenir infecções causadas por *I. liriodendri* e *I. macrodidyma*, durante a fase de enraizamento, no processo de propagação de videiras. Os resultados mostraram que captana, carbendazime, oxicleto de cobre, cloreto de didecildimetilamónio, sulfato de hidroxiquinolina e procloraz diminuíram os valores de severidade da doença em raízes, para ambas as espécies, em comparação com a testemunha não tratada. No entanto, apenas a captana, carbendazime e o cloreto de didecildimetilamonio originaram percentagens de reisolamento significativamente inferiores à testemunha, no caso das estacas inoculadas com *I. liriodendri*, e procloraz no caso das estacas inoculadas com *I. macrodidyma*.

Também a imersão do material de propagação antes da enxertia em benomil, carbendazime, cloreto de didecildimetilamónio ou captana resultaram em reduções significativas dos níveis de infecção de *Pa. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* na zona basal e de enxertia das plantas de viveiro (Fourie & Halleen, 2004b; Fourie & Halleen, 2006; Gramaje *et al.*, 2010). No entanto estes tratamentos não originaram efeito na infecção de patógenos causadores da doença do pé negro da videira, maioritariamente devido ao facto das infecções causadas por estes patógenos ocorrerem sobretudo a partir dos solos de viveiro (Halleen *et al.*, 2003).

Nos últimos anos tem sido estudada a aplicação de fungicidas para protecção das feridas de poda em plantas-mãe de porta-enxertos. Contudo, a gama de produtos registada é limitada, estes são de largo espectro de acção, não conferem protecção a longo prazo e a aplicação pode ser difícil e dispendiosa (Rolshausen *et al.*, 2010).

Como mencionado anteriormente, os agentes causais da doença do pé-negro da videira infectam sobretudo as estacas de videira quando estas são plantadas em solo de viveiro (Halleen *et al.*, 2003). O controlo deve assim focar-se na prevenção das infecções na zona basal das estacas através do tratamento das mesmas antes da plantação, proporcionando uma protecção adicional à base do porta-enxerto durante o processo de enraizamento (Rego *et al.*, 2009).

Por não demonstrarem eficiência e por conduzirem a desequilíbrios microbiológicos do solo, as desinfecções do solo também não representam uma solução viável no combate a *Ilyonectria* spp. (Traquair, 1995; Martínez *et al.*, 2004). Um ensaio de campo realizado por Rego *et al.* (2001a), em solo de viveiro de porta-enxertos localizado na região do Ribatejo e Oeste permitiu verificar que a aplicação de dazomete e metame-sódio levava apenas a uma ligeira diminuição do número de plantas atacadas, relativamente à testemunha, que não era, no entanto, significativa.

Apesar dos esforços efectuados na selecção de fungicidas com eficácia no controlo dos agentes causais do pé-negro (e também dos responsáveis pela doença de Petri), os múltiplos locais onde estes fungos residem (materiais de propagação, solo, ar) tem dificultado esta estratégia. Por sua vez, o aumento das restrições legais ao uso de fungicidas tem originado que alguns dos produtos mais eficazes tenham sido retirados do mercado (benomil, formulações contendo carbendazime, entre outros) (H. Oliveira, comunicação pessoal).

1.3.4.4. Mistos

O tratamento com água quente, a diferentes combinações de temperatura e tempo de exposição tem-se manifestado eficaz no controlo do pé negro em viveiros vitícolas em países como Austrália (Waite & May, 2005; Waite & Morton, 2007), Nova Zelândia (Graham, 2007), África do Sul (Crous *et al.*, 2001; Fourie & Halleen, 2004a) e Espanha (Gramaje *et al.*, 2009a). Contudo, continuam a haver registos de grandes perdas de material vegetal quando o tratamento com água quente é de longa duração (50°C durante 30 min.) aplicado a estacas e a enxertos-prontos enraizados (Gramaje & Armengol, 2011).

O tratamento com água quente de estacas de porta-enxertos antes da enxertia (Edwards *et al.*, 2004; Fourie & Halleen, 2004b; Eskalen, 2007), ou o tratamento com água

quente de plantas de viveiro dormentes após enraizamento (Fourie & Halleen, 2002a; Fourie & Halleen, 2004b; Gramaje *et al.*, 2009a; Gramaje *et al.*, 2010), tem sido fortemente recomendado para a redução dos níveis de infecção em plantas de viveiro. Apesar de o tratamento com água quente poder ser aplicado a videiras antes da sua comercialização, viveiros na Austrália preferem utilizar este tratamento antes da estratificação, de forma a evitar a possibilidade de litigação, por parte dos clientes, decorrente de falhas nas vinhas resultantes do tratamento com água quente (Waite & May, 2005; Waite, 2010).

O óptimo da combinação temperatura/tempo do tratamento com água quente tem sido intensivamente investigado e discutido não se tendo, no entanto, chegado ainda a nenhum consenso. Até agora o procedimento tem sido padronizado a 50°C durante 30 min., no entanto, estudos recentes têm demonstrado que esta combinação nem sempre origina um controlo efectivo para os organismos alvo (Rooney & Gubler, 2001; Whiting, 2001; Habib, 2009; Serra, 2009), ou pode resultar em danos para as videiras jovens (Bleach *et al.*, 2009; Habib *et al.*, 2009). Waite & Morton (2007) sugerem que a tolerância das plantas e dos seus patogénios ao tratamento com água quente é afectada pelas condições ambientais em que as estacas se desenvolvem. Neste sentido, Graham (2007) e Bleach *et al.* (2009) concluíram que as estacas e os seus patogénios, originárias de climas frios na Nova Zelândia, eram mais susceptíveis ao tratamento com água quente e que o uso de temperaturas abaixo dos 50°C reduzia a incidência de *Pa. chlamydospora* e *Ilyonectria* spp.. Em Espanha, Gramaje *et al.*, (2008; 2009a; 2010) fixaram os 53°C durante 30 min. como o tratamento mais eficiente para reduzir a germinação de conídios e o crescimento micelial dos patogénios causadores de pé-negro da videira e da doença de Petri, sem efeitos negativos para as estacas de videira.

1.4. Métodos de detecção e quantificação de *Cylindrocarpon* spp.

O diagnóstico do pé-negro não deve ser efectuado apenas com base na observação visual dos sintomas, quer ao nível da vegetação, quer ao nível do lenho da videira, pois os sintomas causados por *Ilyonectria* spp. em *Vitis* spp. são muito semelhantes aos sintomas originados por espécies do género *Phaeocremonium* e por *Pa chlamydospora*, responsáveis pela doença de Petri (Scheck *et al.*, 1998b; Fourie & Halleen, 2001a; Rego *et al.*, 2001a)

A incidência e severidade de *Ilyonectria* spp. em material vegetal são normalmente avaliadas através de métodos tradicionais de isolamento microbiológico, seguido da identificação das espécies micológicas presentes em cultura. Fragmentos de madeira doente são colocados em placas de Petri contendo meio de cultura semi-selectivo e, após o período de incubação, os fungos presentes na amostra são examinados e frequentemente

repicados para obtenção de culturas puras, para estudo das suas características fenotípicas, designadamente culturais e morfológicas.

As principais características culturais a avaliar incluem a textura, densidade, cor (frente e verso da colónia), frente de crescimento, transparência e zonagem, taxa de crescimento da colónia, odor, produção de clamidósporos e de microconídios, forma e tamanho dos macroconídios, número de septos dos conídios, características das células conidiais ou das estruturas de suporte (Brayford, 1992; Rego 2004). Caso se formem em cultura (isolados auto-férteis), ou após cruzamento (isolados auto-estéreis), a caracterização deve também incidir sobre a morfologia e biometria das peritecas, tal como dos ascósporos resultantes (Halleen *et al.*, 2006b).

No entanto, as características morfológicas de *Ilyonectria* spp. são sensíveis às condições culturais e os isolados tendem a deteriorar-se quando crescem em condições inapropriadas, devendo por isso ser utilizados métodos convenientes e normalizar os meios e as condições de incubação (Brayford, 1992).

Utiliza-se normalmente o meio de gelose de batata dextrosada (PDA), utilizado no estudo da morfologia e pigmentação da colónia e o meio "Spezieller Nährstoffarmer Agar" adicionado de 0,1 % de extracto de levedura (SNAY), que promove a esporulação uniforme e facilita a observação das células conidiais (Brayford, 1992). Também o meio de Oatmeal Agar (OA) é recomendado para caracterização morfológica e cultural de fungos *Ilyonectria* (Crous *et al.*, 2009).

As técnicas clássicas de diagnóstico são demoradas e requerem conhecimento especializado pois alguns dos fungos presentes na madeira não chegam a crescer no meio de cultura, não sendo por isso detectados; muitas espécies de fungos podem estar presentes num único fragmento de madeira; os fungos têm diferentes taxas de crescimento, sendo que os de crescimento mais rápido podem ocultar os de crescimento mais lento; e a identificação do patógeno através das características fenotípicas nem sempre é simples. Por estas razões, o recurso a métodos moleculares tem sido cada vez mais usado para a detecção de agentes patogénicos das plantas, incluindo os que atacam a videira (Gramaje, 2011). Embora a detecção por métodos moleculares constitua um passo importante no diagnóstico de doenças das plantas, não o substitui na íntegra. Tendo por base os Postulados de Koch, poderão substituir o 1º e 2º Postulados (isolamento/caracterização/identificação), mas fica por esclarecer se os fungos detectados são efectivamente capazes de provocar doença em videira, se se conseguem reisolar e se mantêm características idênticas aos inicialmente observados (3º e 4º Postulados). Ainda

como inconveniente, as técnicas baseadas na detecção de DNA, não permitem distinguir células viáveis e inviáveis.

A detecção de fungos do género *Ilyonectria* por via molecular, a partir de tecidos de videira infectados e de solo, tem sido baseada na técnica de "nested-PCR", que consiste numa primeira amplificação de toda a região ITS (Espaçador Internamente Transcrito), utilizando um iniciador universal (ITS4) e um iniciador específico para fungos (ITS1F), seguida de outra amplificação, numa reacção múltipla de PCR, utilizando dois iniciadores específicos para o fungo que se pretende detectar. Esta técnica é útil quando se verifica a existência de impurezas que inibem a amplificação do DNA nas amostras, ou quando se verifica a existência de quantidades muito baixas de DNA do agente patogénico alvo (Fungaro, 2000).

Para a detecção de fungos *Ilyonectria* spp. (antes *Cylindrocarpon* spp.), através de nested-PCR, na segunda amplificação são utilizados iniciadores construídos por Hamelin *et al.* (1996), com o objectivo inicial de detectar *C. destructans* em sementes de coníferas. Esses iniciadores, Dest1 (5'-TTGTTGCCTCGGCGGTGCCTG-3') e Dest4 (5'-GTTTAACGGCGTGGCCGCGCTGTT-3'), produzem fragmentos de aproximadamente 400 pb (Hamelin *et al.*, 1996; Nascimento *et al.*, 2001; Damm & Fourie, 2005). Por sua vez, Nascimento *et al.* (2001) verificaram que todos os isolados da colecção analisada, maioritariamente *I. liriodendri*, mas também outros que se vieram a revelar *I. macrodidyma*, produziam fragmentos daquela dimensão (400 pb).

Recentemente, Alaniz *et al.* (2009a) desenharam um conjunto de três pares de iniciadores (Lir1/Lir2, Mac1/MaPa2 e Pau1/MaPa2) permitindo distinguir as espécies *I. liriodendri*, *I. macrodidyma* e "*C. pauciseptatum*" num PCR múltiplo. Posteriormente, Mostert *et al.* (2010) desenvolveram iniciadores específicos a partir da região do gene de beta-tubulina (BT) para identificar *I. liriodendri* (CylIF e CylIR), *I. macrodidyma* (CymaF e CymaR), *Campyl. fasciculare* (CafaF e CafaR) e *Campyl. pseudofasciculare* (CapsF e CapsR) a partir do solo e raízes de videira com resultados promissores.

Na técnica PCR o sucesso de amplificação depende, por um lado do uso de iniciadores específicos correctos para os organismos alvo, assim como de uma eficiente extracção de DNA alvo (Miller *et al.*, 1999; Martin-Laurent *et al.*, 2001). Esta fase de extracção é crucial quando se pretendem analisar amostras provenientes de matrizes complexas, como é o caso do solo.

Actualmente tem sido utilizada a técnica PCR quantitativa em tempo real (qPCR) na detecção e quantificação de fungos do solo, em solo e em material vegetal (MacCartney *et al.*, 2003; Lievens *et al.*, 2006), possuindo maior sensibilidade comparativamente ao PCR convencional (Tewoldemedhin *et al.*, 2011).

A qPCR é uma técnica que detecta e regista a fluorescência emitida por um fluorocromo incorporado no novo produto de PCR através de uma câmara, sendo possível acompanhar a fase exponencial de amplificação em tempo real e, desta forma, quantificar o DNA com precisão, no início da corrida (Whittwer *et al.*, 1997; Bates *et al.*, 2001; Gachon *et al.*, 2004).

Recentemente, foi desenvolvida a técnica qPCR usando iniciadores específicos da área do gene nuclear de beta-tubulina (BT) para testar a presença de *I. liriodendri* e *I. macrodidyma* em amostras de solo. Os resultados mostraram que este método era capaz de detectar pequenas quantidades de DNA específico no solo, demonstrando também perdas aparentes de DNA de fungo ao longo do tempo de conservação (Probst, 2010).

A qPCR representa um considerável avanço, relativamente às técnicas anteriormente disponíveis, em patologia vegetal (Schaad & Frederick, 2002; Schena *et al.*, 2004), contudo, até ao momento ainda não é possível estabelecer uma relação entre a doença e a concentração do DNA alvo, o que torna a qPCR uma ferramenta apenas de estimativa do potencial da doença.

Recentemente, têm sido desenvolvidas técnicas de identificação simultânea de múltiplos fungos patogénicos. Weir & Graham (2008; 2009) adaptaram o RFLP terminal para a monitorização de populações de fungos endofíticos e patogénicos no xilema, durante a propagação do material vitícola em viveiro. Este método foi capaz de detectar *Ilyonectria* spp., espécies de *Botryosphaeriaceae*, *Phaeacremonium* spp. e *Pa. chlamydospora* ao nível das espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

De forma a identificar possíveis focos de infecção de fungos responsáveis pela doença do pé-negro em viveiro vitícola, foram recolhidas diversas amostras nas várias fases do processo de produção de enxertos-prontos de videira, tais como material vegetal (estacas de porta-enxertos, garfos, estacas estratificadas e enxertos-prontos), amostras de solo de vinhas-mãe de porta-enxertos e de garfos e de viveiro, lâminas de instrumentos de corte, água da torneira e dos tanques de hidratação, substrato utilizado na fase de estratificação e parafina (Fig. 2.1). Foram ainda recolhidas amostras de solo em terrenos que se destinavam à plantação de viveiro e que se encontravam a cumprir o ciclo de rotação legalmente imposto para os viveiros vitícolas.

As amostras foram colhidas ao longo de vários meses, sendo provenientes de várias empresas do sector viveirista, sediadas na região Oeste, com actividade há vários anos, produzindo material de propagação vitícola certificado, praticando uma rotação de 3 anos com diferentes culturas, maioritariamente hortícolas.

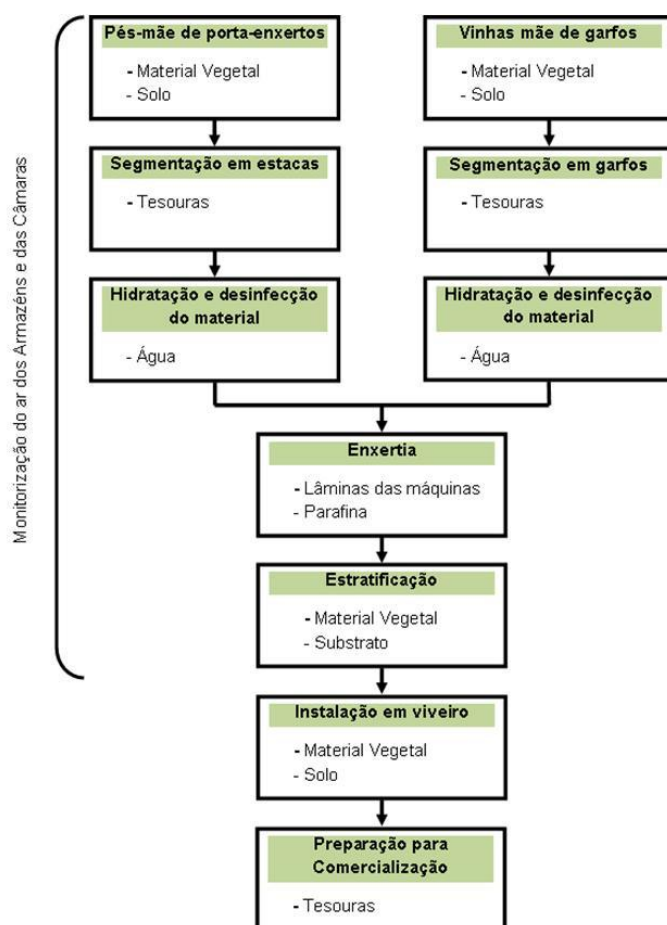


Fig. 2.1. Esquematização da recolha de amostras ao longo das várias fases do processo de propagação de material vitícola.

Com o objectivo de detectar a presença ou ausência de fungos do género *Ilyonectria*/"*Cylindrocarpon*", todas as amostras foram submetidas a análise por métodos clássicos de isolamento microbiológico, aplicando-se ainda a algumas das amostras técnicas de biologia molecular, nomeadamente a amostras de material vegetal, solos, substratos e águas.

2.1. Caracterização das amostras e isolamento de fungos

2.1.1. Material vegetal

Foram colhidas de forma aleatória estacas do porta-enxerto 110R e do porta-enxerto 1103P, varas da casta Touriga Nacional e varas da casta Aragonez, provenientes de dois viveiristas. Foram também colhidas cinco amostras aleatórias de 10 plantas estratificadas das caixas de estratificação provenientes de um viveirista. Colheram-se ainda 11 amostras de enxertos-prontos já enraizados com diferentes combinações de casta/porta-enxerto, provenientes de cinco viveiristas (Quadro 2.1).

Quadro 2.1. Identificação das amostras de material material destinado à enxertia, material enxertado e enxertos-prontos enraizados provenientes de diferentes viveiros localizados na região Oeste

Porta-enxerto	Casta	Nº de Amostras	Tipo de material
110R	-	10	Estacas de porta-enxerto
1103P	-	20	Estacas de porta-enxerto
-	Touriga Nacional	10	Varas de <i>Vitis vinifera</i>
-	Aragonez	20	Varas de <i>Vitis vinifera</i>
110R	Caladoc	10	Estratificado
110R	Moscatel Roxo	10	Estratificado
1103P	Gouveio	10	Estratificado
1103P	Fernão Pires	10	Estratificado
110R	Caladoc	10	Enxertos-prontos
110R	Moscatel Roxo	10	Enxertos-prontos
110R	Touriga Nacional	10	Enxertos-prontos
110R	Rabigato	10	Enxertos-prontos
1103P	Gouveio	10	Enxertos-prontos
1103P	Fernão Pires	10	Enxertos-prontos
1103P	Touriga Franca	10	Enxertos-prontos

Quadro 2.1. Identificação das amostras de material enxertado e enxertos-prontos enraizados provenientes de diferentes viveiros localizados na região Oeste (continuação)

Porta-enxerto	Castas	Nº de Amostras	Tipo de material
1103P	Alicant Bouschet	10	Enxertos-prontos
1103P	Touriga Nacional	10	Enxertos-prontos
99R	Aragonez	10	Enxertos-prontos
99R	Jaen	10	Enxertos-prontos

Os isolamentos microbiológicos foram obtidos a partir da zona basal, no caso das estacas de porta-enxertos e das varas das castas, e a partir de quatro zonas distintas (Nível acima da enxertia; Nível da enxertia; Nível abaixo da enxertia; Nível basal) no caso dos enxertos estratificados e no caso dos enxertos-prontos já enraizados (Fig. 2.2).

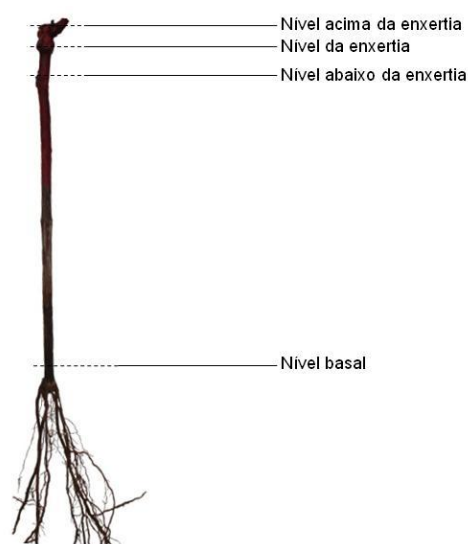


Fig. 2.2. Ilustração das quatro secções transversais de corte realizadas aos níveis basal, abaixo da enxertia, enxertia e acima da enxertia em enxertos-prontos enraizados utilizados nos isolamentos.

Para a realização dos isolamentos microbiológicos procedeu-se à remoção do ritidoma e seccionamento transversal da zona a isolar. Os fragmentos de madeira foram desinfectados em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 7% durante 2 minutos e passados por água destilada esterilizada durante 30 segundos. Seguidamente, os fragmentos foram secos em papel de filtro e transferidos para placas de Petri com 90 mm de diâmetro contendo 15 ml de gelose de batata dextrosada (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), suplementado, após autoclavagem e arrefecimento a 45°C, com 250 mg de cloranfenicol por litro de meio. Posteriormente, incubaram-se as placas à temperatura de 20±1°C, na obscuridade. Após o

período de incubação, variável conforme o desenvolvimento das colónias, procedeu-se sempre que possível ao registo de fungos presentes e posterior repicagem das colónias dos fungos de interesse para placas de Petri com 90 mm de diâmetro contendo PDA.

2.1.2. Amostras de solo e substrato

Foram colhidas amostras de solo de parcelas onde são mantidos os pés-mãe dos porta-enxertos 110R e 1103P e das vinhas-mãe das castas Touriga Nacional e Aragonez.

Colheram-se ainda amostras de solo antes da plantação e após o período de enraizamento das plantas em viveiro, provenientes de parcelas pertencentes a diferentes viveiristas (Quadro 2.2). Em cada parcela de terreno, com o auxílio de uma sonda, foram colhidas aleatoriamente 12 sub-amostras de solo, a cerca de 20 cm de profundidade e junto às raízes das plantas, que depois foram misturadas homogeneamente numa amostra única, por parcela. Entre cada colheita os instrumentos utilizados (sonda e pá) foram desinfectados com álcool etílico a 70%.

Foram ainda colhidas amostras de substrato (turfa) antes e depois da sua utilização na fase de estratificação. A recolha de substrato foi realizada de forma aleatória, tendo sido recolhidas amostras de substrato de caixas de estratificação contendo plantas enxertadas com a combinação casta/porta-enxerto Moscatel Roxo x 110R (Quadro 2.1).

As misturas de solo e de substrato foram depois secas à temperatura ambiente, de forma a eliminar a humidade e passadas por um crivo de malha 2 mm de diâmetro, de forma a eliminar os elementos grosseiros e restos de matéria orgânica de maior dimensão. As misturas foram depois guardadas em tubos *Falcon* e mantidas a 4°C até à sua utilização.

Quadro 2.2. Identificação das amostras de solo provenientes de diferentes viveiros localizados na região Oeste

Solo	Cultura actual	Cultura anterior	Local de Colheita
1	Pés-mãe de porta-enxertos 110R	na.	Pó-Bombarral
2	Pés-mãe de porta-enxertos 1103P	na.	Pó-Bombarral
3	Pés-mãe de porta-enxertos 1103P	na.	Pó-Bombarral
4	Vinhas-mãe de Touriga Nacional	na.	Sobral de Monte Agraço
5	Vinhas-mãe de Aragonez	na.	Sobral de Monte Agraço
6	Couve-brócolo	Azevém	Pó-Bombarral
7	Cenouras	Couve-brócolo	Pó-Bombarral

Quadro 2.2. Identificação das amostras de solo provenientes de diferentes viveiros localizados na região Oeste (continuação)

Solo	Cultura actual	Cultura anterior	Local de Colheita
8	Cenouras	Batata	Pó-Bombarral
9	Batata-doce	Fava	Pó-Bombarral
10	N/d	Couve-brócolo	Óbidos
11	N/d	Couve-brócolo	Pó-Bombarral
12	Viveiro vitícola	Cenoura	Lourinhã
13	Viveiro vitícola	Batata	Caldas da Rainha
14	Viveiro vitícola	Cebola	Pó-Bombarral
15	Viveiro vitícola	Cebola	Pó-Bombarral
16	Viveiro vitícola	Cenoura	Pó-Bombarral
17	Viveiro vitícola	Sorgo	Pó-Bombarral
18	Viveiro vitícola	Sorgo	Pó-Bombarral
19	Viveiro vitícola	Fava	Pó-Bombarral
20	Viveiro vitícola	Cenoura	Pó-Bombarral
21	Viveiro vitícola	Cenoura	Pó-Bombarral
22	Viveiro vitícola	Couve-brócolo	Pó-Bombarral

A partir das amostras de solo colhidas junto das raízes foram feitas diluições sucessivas para a detecção de fungos dos géneros *Ilyonectria*/"*Cylindrocarpon*".

Para as diluições sucessivas foram utilizados 10 g de cada amostra de solo, diluídos em 90 ml de água destilada esterilizada à qual se adicionaram duas gotas de Tween 80®. A suspensão foi agitada durante 30 min. numa mesa de agitação (Agitorb 160 E, Abalab) a 180 rpm e dessa suspensão foram realizadas diluições sucessivas até à diluição 10^{-3} . De cada diluição foi retirada uma alíquota de 0,5 ml e colocada em duas placas de Petri contendo 15 ml de PDA suplementado, após autoclavagem e arrefecimento a 45°C, com 250 mg de cloranfenicol por litro de meio. Posteriormente, incubaram-se as placas à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, na obscuridade.

Após o período de incubação necessário, procedeu-se ao registo da presença ou ausência de fungos com características culturais semelhantes aos dos géneros

Ilyonectria/"*Cylindrocarpon*" e posterior repicagem dessas colônias para placas de Petri com 90 mm de diâmetro contendo PDA.

2.1.3. Monitorização do ar de câmaras e armazéns

Foram recolhidas amostras do ar através da colocação de placas de Petri contendo 15 ml de PDA suplementado com cloranfenicol(250 mg/l). Duas placas foram abertas durante 30 min. em cada um dos três armazéns e oito câmaras pertencentes a uma empresa viveirista. Repetiu-se o procedimento de 15 em 15 dias durante 4 meses, num total de 7 recolhas (Anexo B).

Posteriormente, incubaram-se as placas à temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, na obscuridade.

Após o período de incubação necessário procedeu-se ao registo da presença ou ausência de fungos com características análogas às dos géneros *Ilyonectria*/"*Cylindrocarpon*" e posterior repicagem das colônias para placas de Petri com 90 mm de diâmetro contendo PDA.

2.1.4. Água do furo e tanques de hidratação

Foram recolhidos 250 ml de água da torneira, 250 ml de água dos tanques de hidratação dos porta-enxertos e 250 ml de água do tanque de hidratação dos garfos.

Para cada amostra de água, foram plaqueadas alíquotas de 0,5 ml em placas de Petri com 90 mm de diâmetro contendo 15 ml de PDA suplementado com cloranfenicol (250 mg/l) e espalhadas com o auxílio de uma vareta de vidro dobrada em ângulo recto. As placas foram mantidas a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, na obscuridade. Após o período de incubação necessário procedeu-se tal como referido em 2.1.2.

2.1.5. Instrumentos de corte

A recolha de amostras dos instrumentos de corte foi feita através do humedecimento de zaragatoas esterilizadas com água esterilizada e posterior passagem pelas lâminas de corte.

Foram recolhidas três amostras de lâminas de tesouras utilizadas na segmentação de estacas de porta-enxertos, três amostras de lâminas de tesouras utilizadas na segmentação de garfos, sete amostras de lâminas de tesouras utilizadas na poda de enxertos-prontos enraizados e 17 amostras de lâminas de máquinas de enxertia de corte em ómega.

As zaragatoas foram acondicionadas em tubos *ependorf* e guardadas a 4°C até à sua utilização em laboratório.

Para o efeito de isolamento, fez-se a passagem das zaragatoas por duas placas de Petri com 90 mm de diâmetro, contendo 15 ml de PDA suplementado com cloranfenicol (250 mg/l), através da técnica de riscado. As condições de incubação, o registo de resultados e a repicagem das culturas foram em tudo idênticas às descritas em 2.1.2..

2.1.6. Parafina

Recolheram-se amostras de parafina ainda por utilizar e parafina fundida utilizada na parafinação do material enxertado. A parafina não utilizada foi acondicionada em tubos *ependorf*, a parafina utilizada foi acondicionada num tubo de ensaio. Todas as amostras foram guardadas a 4°C até à sua utilização em laboratório.

Os isolamentos microbiológicos foram feitos em placas de Petri com 90 mm de diâmetro, contendo 15 ml de PDA suplementado com cloranfenicol (250 mg/l) através da colocação de cinco pedaços de parafina ainda por utilizar e parafina fundida já utilizada, tendo sido utilizadas para cada uma das modalidades duas placas.

Após o período de incubação necessário procedeu-se tal como referido em 2.1.2.

2.2. Caracterização cultural dos isolados de *Ilyonectria* e "*Cylindrocarpon*" spp. obtidos

2.2.1. Culturas de referência

Na tentativa de identificação das espécies de *Ilyonectria* e "*Cylindrocarpon*" spp. obtidas, utilizaram-se 24 isolados de referência, da colecção do Laboratório de Patologia Vegetal "Veríssimo de Almeida" (LPVVA) e do CBS-KNAW Fungal Biodiversity, Centre, Utrecht, the Netherlands (CBS), que se encontravam conservados em meio de cultura de PDA, à temperatura de 5°C, na obscuridade (Quadro 2.3, Anexo A).

Quadro 2.3. Isolados de referência de *Ilyonectria* spp. e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* utilizados para fins comparativos com a coleção obtida no presente estudo

Grupo/Espécie	Espécie <i>sensu</i> Cabral <i>et al.</i> (2011a, 2011b)	Código	Origem geográfica
<i>Ilyonectria liriodendri</i>	<i>Ilyonectria liriodendri</i> , type strain	CBS 110.81	EUA
	<i>Ilyonectria liriodendri</i>	Cy1	Portugal
		Cy68	Portugal
<i>Ilyonectria radicola</i> / " <i>Cylindrocarpon</i> <i>destructans</i> "	<i>Ilyonectria robusta</i> , type strain of <i>Ramularia robusta</i>	CBS 308.35	Canada
	<i>Ilyonectria robusta</i>	Cy158	Portugal
		Cy192	Portugal
	<i>Ilyonectria pseudodestructans</i>	Cy22	Portugal
	<i>Ilyonectria europaea</i>	Cy155	Portugal
		Cy241	Portugal
	<i>Ilyonectria lusitanica</i>	Cy197	Portugal
	" <i>Cylindrocarpon</i> " <i>pauciseptatum</i>	Cy196	Portugal
		Cy217	Portugal
<i>I. macrodidyma</i>	<i>Ilyonectria</i> sp. 2	Cy108	Portugal
		Cy200	Portugal
	<i>Ilyonectria estremocensis</i>	Cy144	Portugal
		Cy145	Portugal
	<i>Ilyonectria alcacerensis</i>	Cy134	Espanha
	<i>Ilyonectria novozelandica</i>	CBS 112593	África do Sul
		CBS 113552	Nova Zelândia
	<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	CBS 112601	África do Sul
		CBS 112603	África do Sul
		CBS 112615	África do Sul
	<i>Ilyonectria torresensis</i>	Cy136	Portugal
		Cy218	Portugal

2.2.2. Características avaliadas

Quer as culturas de referência, quer as que se obtiveram no decurso do presente estudo, foram repicadas para placas de Petri de 55 mm de diâmetro, contendo 6 ml de PDA e incubadas à temperatura de 20°C, na obscuridade, durante cerca de uma semana. Estas culturas serviram de pré-inóculo para se estabelecer o ensaio seguinte.

Para a observação das características culturais dos isolados obtidos (Anexo C) utilizou-se o meio de cultura PDA. Inocularam-se placas de Petri com 90 mm de diâmetro, contendo 15 ml de meio de cultura, sendo estas posteriormente colocadas em estufa a 20±1°C, na

obscuridade durante 12 dias (Samuels & Brayford, 1990). Como inóculo, utilizaram-se cilindros de gelose com aproximadamente 3 mm de diâmetro e de altura que foram retirados da periferia de cada uma das colónias obtidas, tal como descrito anteriormente, com o auxílio de um anel cortante.

Findo o período de incubação, observaram-se as seguintes características das culturas: aspecto cultural, densidade da colónia, coloração, frente de crescimento, aspecto à transparência e zonagem. A cor da colónia foi determinada por comparação com a carta de cores de Rayner (1970).

Para confirmação da identidade de alguns isolados de *Ilyonectria macrodidyma* (*sensu lato*), utilizou-se o meio de cultura OA (Oatmeal, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), uma vez que estes formam colónias com margem amarela neste meio de cultura. Observaram-se ainda algumas características morfológicas ao microscópio, designadamente morfologia e tipo de conídios (macro e microconídios), conidióforos e presença ou ausência de clamidósporos de forma a auxiliar a identificação, com recurso a bibliografia especializada (Halleen *et al.*, 2006; Schroers *et al.*, 2008; Cabral *et al.* 2011a, 2011b).

2.3. Análise de material vegetal, solos e águas por técnicas moleculares

2.3.1. Extracção, purificação e quantificação de DNA genómico

Extracção de DNA genómico a partir das amostras de material vegetal

Na extracção de DNA, a partir do material vegetal, utilizaram-se os protocolos descritos por Ceniz (1992) e Nascimento *et al.* (2001), com introdução de algumas modificações.

Após lavagem do material vegetal em água corrente, para remoção de partículas de terra e de detritos orgânicos, procedeu-se à remoção do ritidoma e seccionamento transversal da zona basal, no caso das varas de castas e estacas de porta-enxertos, e da zona basal e da zona acima da enxertia, no caso do material vegetal após enxertia e estratificação e dos enxertos-prontos já enraizados.

Os fragmentos de madeira foram posteriormente congelados e macerados em azoto líquido com o auxílio de um almofariz e de um pilão até ficarem reduzidos a um pó fino. Este foi depois transferido para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, ao qual se adicionaram 650 µl de tampão de extracção (200 mM Tris-HCl, pH 8,0; 250 mM EDTA; 0,5% SDS, p/v), suplementado com 1% de polivinilpirrolidona (PVP, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, agitaram-se os tubos num vortex horizontal durante 15 min. para homogeneização da mistura. Seguidamente, foram adicionados 195 µl de acetato de sódio

3M (pH 5,2) e colocaram-se os tubos de microcentrífuga a -20°C durante 15 min.. Após este passo, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm (Centrífuga Hettich 32R), à temperatura de 4°C durante 10 min. e o sobrenadante foi recolhido para um novo tubo, repetindo-se novamente este passo com o objectivo de remover totalmente as partículas sólidas. Adicionou-se depois ao sobrenadante igual volume de isopropanol frio para precipitação do DNA.

Os tubos foram deixados à temperatura ambiente durante 5 min. e agitados lentamente por inversão até à formação de um "novelo" (nem sempre observado).

Fez-se uma centrifugação durante 10 min. a 13000 rpm a 4°C, à qual se sucedeu a eliminação do sobrenadante e lavagem do *pellet* com 1 ml de etanol frio a 70%. Foi efectuada uma nova centrifugação durante 2 min. nas condições anteriormente descritas. Decantou-se o sobrenadante e secou-se o *pellet* à temperatura ambiente, procedendo-se depois à sua ressuspensão através da adição de 25 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) com o objectivo de solubilizar os ácidos nucleicos.

Extracção de DNA genómico a partir das amostras de solo e de substrato

O DNA foi extraído utilizando uma adaptação do protocolo descrito por Damm & Fourie (2005).

A 0,5 g de solo foram adicionados 0,5 g de esferas de vidro (acid glass beads) de 100 µm (Sigma Aldrich G4649) e 0,5 g de esferas de vidro de 2 mm, previamente esterilizadas num tubo de microcentrífuga de 2 ml.

No caso das amostras de substrato, estas foram previamente maceradas em azoto líquido com o auxílio de um almofariz e de um pilão.

Adicionaram-se depois 300 µl de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 8,0) e 300 µl de tampão de extracção SDS (100 mM NaCl, 500 mM Tris pH 8, 10% SDS) e a solução foi misturada por inversão. De seguida, foram adicionados 400 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1).

Os tubos foram seguidamente agitados horizontalmente num vortex durante 10 min. à velocidade máxima. Centrifugaram-se depois os tubos durante 10 min. a 13000 rpm, ao fim do qual descartou-se a fase orgânica e transferiu-se a fase aquosa para novos tubos de microcentrífuga.

De seguida adicionou-se 1/2 do volume final de acetato de amónio frio (5 M) e inverteram-se os tubos. Centrifugou-se novamente durante 10 min. a 13000 rpm e posteriormente

transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo, ao qual foram adicionados 600 µl de isopropanol frio. Incubaram-se depois os tubos à temperatura ambiente durante 15 min.. Fez-se nova centrifugação durante 5 min. a 13000 rpm após a qual se descartou o sobrenadante. Secou-se depois o *pellet* à temperatura ambiente e ressuspendeu-se em 50 µl de TE (10 mM Tris pH 8,0, 0,1, mM de EDTA).

Extracção de DNA genómico a partir das amostras de água

Centrifugaram-se 50 ml de água em tubos Falcon durante 10 min. a 9000 rpm numa Centrífuga Hettich 32R e descartou-se o sobrenadante. Seguidamente ressuspendeu-se o *pellet* em 2 ml de TE (10 mM Tris pH 8,0, 0,1, mM de EDTA) e agitou-se manualmente durante 5 min.. Posteriormente, adicionou-se 0,5 ml da amostra a 0,5 g de esferas de vidro (acid glass beads) de 100 µm (Sigma Aldrich G4649) e 0,5 g de esferas de vidro de 2 mm, previamente esterilizadas num tubo de microcentrifuga de 2 ml e procedeu-se à extracção segundo o protocolo de extracção utilizado para solos e substrato anteriormente descrito.

Purificação do DNA genómico

A purificação do DNA genómico tem como objectivo obter DNA livre de inibidores da PCR, como ácidos húmicos provenientes do solo ou polissacáridos e compostos fenólicos provenientes do material vegetal.

Para a purificação das amostras de DNA utilizou-se um protocolo adaptado de Damm & Fourie (2005) que consiste numa coluna de purificação na qual é inserida a amostra de DNA a purificar, que é posteriormente centrifugada a baixa velocidade, obtendo-se no final DNA purificado que poderá ser amplificado.

Fez-se uma abertura de 1 mm de diâmetro no fundo de tubos de microcentrifuga de 0,5 ml nos quais foi inserida lã de vidro de forma a tapar o fundo. Estes tubos alterados foram inseridos em tubos de 2 ml de forma a funcionarem como tubos de recolha.

Os tubos alterados foram então preenchidos com uma suspensão de PVPP (polivinilpolipirrolidona) (0,1 g/ml PVPP; 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA), e centrifugados durante 1 minuto a 2240 rpm. O líquido retido nos tubos de 2 ml foi eliminado e o processo foi repetido até a coluna ficar totalmente preenchida com PVPP.

Após a obtenção de uma coluna totalmente preenchida foi efectuada uma nova centrifugação durante 1 minuto a 2240 rpm de forma a eliminar qualquer líquido retido na coluna. Seguidamente, adicionaram-se 100 µl de tampão TE e centrifugou-se durante 1

minuto a 2240 rpm. Por fim, adicionaram-se 50 µl de DNA genómico à coluna e deixou-se à temperatura ambiente durante 5 min., após os quais se fez uma centrifugação durante 5 min. a 2240 rpm.

Quantificação do DNA genómico

A quantificação do DNA obtido foi realizada no aparelho "Biotec" utilizando o software Gen 5TM. A qualidade do mesmo foi observada por electroforese em gel de agarose, através da preparação de um gel de agarose a 0,8% (p/v), utilizando TBE 0,5x (45 mM Tris-base; 45 mM ácido bórico; 1 mM de EDTA, pH 8) o qual foi preparado de acordo com os procedimentos preconizados por Sambrook *et al.* (1989). De seguida, procedeu-se à aplicação, no gel, das amostras com um volume final de 12 µl, contendo 2 µl de suspensão de DNA, 8 µl de água miliQ esterilizada e 2 µl de "gel-loading buffer" (0,25% (p/v) de azul de bromofenol e 40% (p/v) de sacarose em água destilada. Nos poços centrais foram colocadas quantidades conhecidas de DNA do fago λ (5, 10, 25, 50 e 100 ng/µl) misturadas com 8 µl de água miliQ esterilizada e 2 µl de "gel-loading buffer".

A electroforese decorreu numa tina horizontal 20 x 25 cm (largura x comprimento) ("Horizon 20-25, Life Technologies, GibcoBRL, Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus") durante 1 hora a 80 V, sendo esta corrente gerada pela fonte "Electrophoresis Power Supply - EPS 100, Pharmacia Biotec", tendo-se utilizado como tampão de corrida TBE 0,5X.

Após a electroforese, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio (0,5 µg/l), durante 10 min. Seguidamente, imergiu-se o gel em água destilada, durante 20 min.. Visualizaram-se os resultados da quantificação com o auxílio de um transiluminador de luz ultra-violeta (312 nm) "BTX 20.M, UVItec Limited" e registaram-se os mesmos utilizando uma impressora térmica "Mitsubishi Model P91E".

A quantificação e a integridade do DNA genómico extraído foi determinada após o processo de extracção e novamente depois do processo de purificação do mesmo.

2.3.2. Nested - PCR

A identificação de fungos dos géneros *Ilyonectria*/"*Cylindrocarpon*" foi realizada recorrendo à técnica nested-PCR.

Na primeira amplificação foi utilizado um iniciador universal (ITS4) e um iniciador específico para fungos (ITS1F) e na segunda amplificação utilizou-se um par de oligonucleótidos iniciadores referidos por Hamelin *et al.* (1996) como específicos para *Ilyonectria* spp. [Dest1

(5' - TTGTT GCCTC GGCGG TGCCT G - 3') e Dest4 (5' - GGTTT AACGG CGTGG CCGCG CTGTT - 3') - que amplifica fragmentos de 399 a 400 pb].

Todas as reacções foram efectuadas num termociclador "Biometria T-Gradient". Cada reacção de amplificação foi realizada num volume final de 12,50 µl, incluindo 1x tampão de PCR com magnésio incluído, 50 µM de dNTP's, 0,25 µM de cada um dos iniciadores e 0,5 U de Taq DNA polimerase.

Na primeira amplificação foi utilizado o DNA genómico não diluído ou diluído 10 x, no caso de DNA genómico extraído de material vegetal, ou 100x no caso de DNA genómico extraído do solo e substrato de forma a obter-se uma concentração entre 0,5 e 10 ng. Na segunda amplificação utilizou-se o produto obtido na amplificação. Como controlo positivo foi utilizado DNA genómico obtido através de micélio do isolado de Cy2 de *I. liriodendri* e como controlo negativo utilizou-se na mesma mistura de amplificação água MiliQ esterilizada em substituição do DNA.

As reacções de PCR decorreram no termociclador referido. A primeira reacção consistiu no seguinte programa: pré-desnaturação a 95°C, durante 3 min., seguida de 30 ciclos de 30 s. a 94°C (desnaturação), 30 s. a 55°C (hibridação), 1 min. a 72°C (extensão), terminando com um período de 10 min. a 72°C (extensão final). A segunda reacção consistiu em: pré-desnaturação a 95°C, durante 3 min., seguida de 15 ciclos de 20 s. a 94°C (desnaturação), 30 s. a 60°C (hibridação), 1 min. a 72°C (extensão), terminando com um período de 10 min. a 72°C (extensão final) (Cabral, 2002).

Os produtos da amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v) em tampão TBE 0,5x (45 mM Tris-base; 45 mM ácido bórico; 1 mM de EDTA, pH 8), na tina Horizon 11-14, Life Technologies, Gibco BRL, Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus. Em cada um dos poços da extremidade foram colocados 1 µl do marcador molecular "1 kb plus DNA ladder" (Invitrogen) misturados com 5 µl de "gel-loading buffer", enquanto que nos restantes poços se colocou uma amostra com um volume final de 10 µl, constituída por 5 µl dos produtos amplificados e 5 µl de "gel-loading buffer". A electroforese decorreu durante 1 hora e 30 min. a 80V à temperatura ambiente.

Os fragmentos amplificados foram visualizados utilizando um transiluminador de luz ultra-violeta (312 nm), após o gel ter sido corado com brometo de etídio (0,5 µg/l) durante 10 min. e imerso em água destilada, durante 20 min.. Registaram-se os produtos de amplificação utilizando uma impressora térmica "Mitsubishi Model P91E".

2.3.3. Multiplex nested- PCR

Para a identificação de espécies dos géneros *Ilyonectria*/*Cylindrocarpon* recorreu-se à técnica de Multiplex-PCR, adaptada de Alaniz *et al.* (2009). Esta técnica apenas foi utilizada para as amostras de solo, substrato e de água.

Na primeira amplificação foi utilizado um iniciador universal (ITS4) e um iniciador específico para fungos (ITS1F) e na segunda amplificação utilizaram-se três pares de oligonucleótidos iniciadores referidos por Alaniz *et al.* (2009) (Quadro 2.4).

Quadro 2.4. Iniciadores específicos e tamanho dos produtos de amplificação esperados para as espécies *Ilyonectria liriodendri*, *I. macrodidyma* e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*

Espécie	Iniciadores ^a	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto (bp)
<i>I. liriodendri</i>	Lir1	CCCTTGATTTTATAACAGTATC	253
	Lir2	GAGGGCTCGCCGATCT	
<i>I. macrodidyma</i>	Mac1	CCCTGATTACATTTAAGAAGT	387
	MaPa2	TGATCCGAGGTCAAACG	
" <i>C.</i> " <i>pauciseptatum</i>	Pau1	CTAAATTTAGTGGCGGTCA	117
	MaPa2	TGATCCGAGGTCAAACG	

^a 1 - forward e 2 - reverse

Todas as reacções foram efectuadas num termociclador "Biometria T-Gradient". Cada reacção de amplificação foi realizada num volume final de 12,50 µl, incluindo 1x tampão de PCR, 50 µM de dNTP's e 0,5 U de Taq DNA polimerase. As reacções da primeira amplificação incluíam ainda 0,25 µM de cada um dos iniciadores ITS4 e ITSF e as reacções da segunda amplificação, 0,25 µM de cada um dos iniciadores Lir1, Lir2, Mac1, Pau1 e 0,5 µM do iniciador MaPa2.

Na primeira amplificação foi utilizado o DNA genómico diluído 100x. e na segunda amplificação utilizou-se o produto obtido na amplificação anterior diluído 100 x. Como controlo positivo foi utilizada uma mistura de DNA genómico, obtido através de micélio de três isolados de *I. liriodendri* (Cy1), *I. macrodidyma* (130) e "*C.*" *pauciseptatum* (238/2), em iguais proporções. Como controlo negativo utilizou-se na mesma mistura de amplificação água MiliQ esterilizada em substituição do DNA.

A primeira reacção de amplificação decorreu de acordo com o seguinte programa: pré-desnaturação a 95°C, durante 3 min., seguida de 30 ciclos de 30 s. a 94°C (desnaturação), 30 s. a 55°C (hibridação), 1 min. a 72°C (extensão), terminando com um período de 10 min. a 72°C (extensão final). A segunda reacção consistiu em: pré-desnaturação a 94°C, durante 3 min., seguida de 30 ciclos de 30 s. a 94°C (desnaturação), 30 s. a 60°C (hibridação), 45 s. a 72°C (extensão), terminando com um período de 10 min. a 72°C (extensão final).

Os produtos da amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) em tampão TBE 0,5x (45 mM Tris-base; 45 mM ácido bórico; 1 mM de EDTA, pH 8), na tina Horizon 11-14, Life Technologies, Gibco BRL, Horizontal Gel Electroforesis Apparatus. Em cada um dos poços da extremidade foram colocados 1 µl do marcador molecular "1 kb plus DNA ladder" (Invitrogen) misturados com 5 µl de "gel-loading buffer", enquanto que nos restantes poços se colocou uma amostra com um volume final de 10 µl, constituída por 5 µl dos produtos amplificados e 5 µl de "gel-loading buffer". A electroforese decorreu durante 2 horas a 120V à temperatura ambiente.

Os fragmentos amplificados foram visualizados e registados, tal como descrito em 2.3.2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Incidência de *Ilyonectria*“*Cylindrocarpon*” e de outros fungos do lenho da videira em material vegetal por isolamento microbiológico

3.1.1. Estacas de vinhas-mãe de porta-enxertos e de garfos

A incidência de fungos do lenho da videira em estacas destinadas à enxertia, preparadas a partir de varas colhidas em campos de pés-mãe de porta-enxertos e vinhas-mãe de garfos, revelou a presença, entre outros, de fungos *Ilyonectria* spp., causadores de pé-negro da videira, *Pa. chlamydospora*, agente causal da doença de Petri e fungos Botryosphaeriaceae, responsáveis por diversas doenças na videira, designadamente por cancros, Black-dead arm e sintomas semelhantes a escoriose (Rego *et al.* 2000; van Niekerk *et al.*, 2006; Vaz, 2008) (Fig. 3.1).

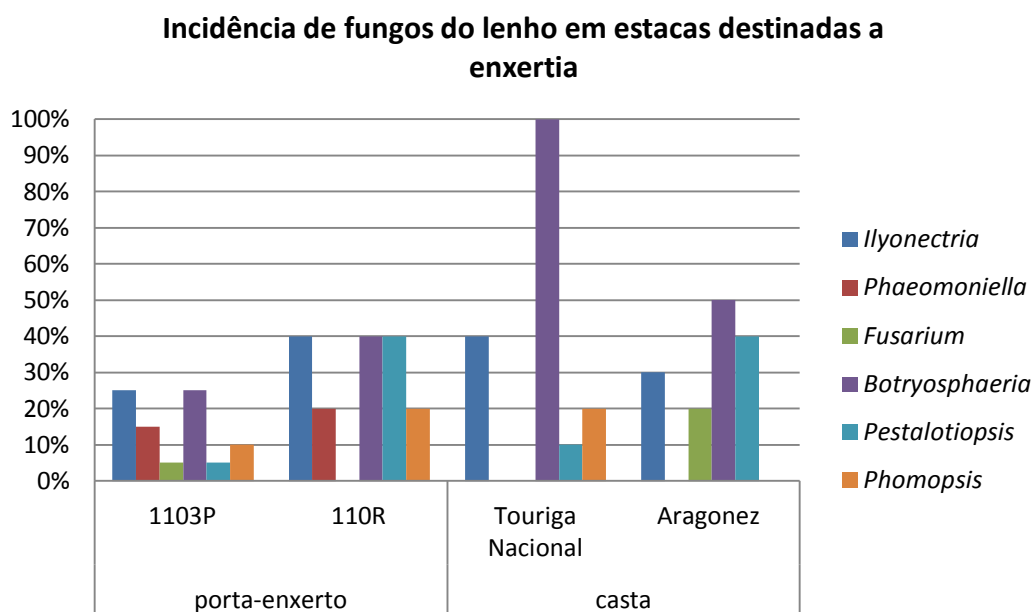


Fig. 3. 1. Incidência (%) de fungos de lenho em estacas destinadas à enxertia. As médias baseiam-se numa amostragem de 10 estacas por porta-enxerto e casta, excepto para 1103P e Aragonez, em que foram analisadas duas amostras de 10 estacas.

A ocorrência dos fungos referidos, sobretudo ao nível das estacas de porta-enxertos, é conhecida, embora por vezes no caso de *Ilyonectria* spp. e de *Pa. chlamydospora*, os métodos clássicos não permitam a sua detecção, pois estes fungos poderão ser ocultados por outros de crescimento mais rápido. Um estudo anterior, realizado numa vinha-mãe do porta-enxerto 1103P, permitiu verificar que, apesar das plantas se encontrarem severamente infectadas por aqueles fungos, ao nível do tronco, estes não eram detectados

nas varas do ano (Pinto *et al.*, 2005). Contrariamente aos resultados desse estudo, os resultados agora obtidos permitem verificar a infecção deste tipo de material, por métodos microbiológicos.

O tipo de condução das vinhas-mãe de porta-enxertos, em que as varas se desenvolvem horizontalmente sobre o solo, é propício à contaminação dos materiais, a partir de inóculo existente no solo. Pelo contrário, torna-se difícil de explicar este modo de contaminação para as vinhas-mãe de garfos, cujas varas são conduzidas na vertical. Quer no caso da Touriga Nacional quer no da casta Aragonez, a incidência média de fungos *Ilyonectria* é elevada (Fig, 3.1). Estes resultados podem estar relacionados com o facto de as varas das vinhas-mãe de garfos, à poda serem deixadas no solo da vinha até à sua recolha, que pode por vezes ir até 3 dias. Coloca-se também a hipótese destes fungos estarem a ser disseminados por via aérea. Este assunto será novamente discutido na análise do caso de estudo – Touriga Nacional X 110R.

3.1.2. Enxertos-prontos de videira

A análise global de fungos do lenho da videira em enxertos-prontos (porta-enxertos 1103P, 110R e 99 R), com origem em cinco viveiristas, é indicada na Fig. 3.2. Estes resultados referem-se a dados obtidos aquando do arranque dos enxertos prontos do viveiro, após o período de enraizamento. A comparação entre a eventual diferença de susceptibilidade entre porta-enxertos não foi realizada, uma vez que as médias se referem a amostras de dimensão muito desigual (1103P, 60 plantas; 110R, 40 plantas e 99R, 20 plantas), colhidas em diferentes viveiros. Também se salienta que não foi o objectivo deste estudo apurar a eventual diferença de susceptibilidade entre porta-enxertos ao pé-negro da videira, mas sim detectar a presença de *Ilyonectria* por métodos clássicos e comparar posteriormente os resultados com os resultantes da aplicação de métodos biomoleculares.

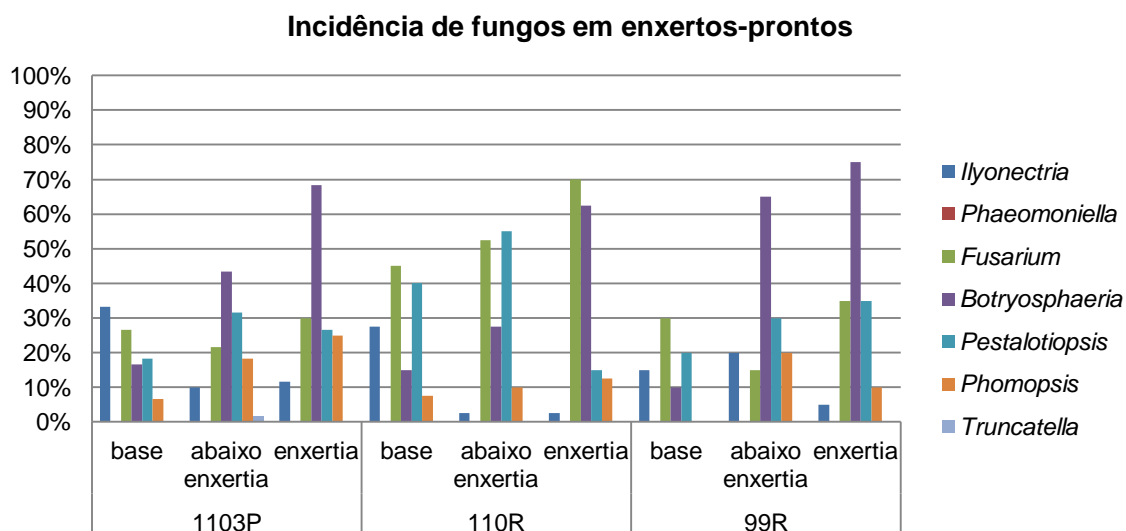


Fig. 3.2. Incidência (%) de fungos de lenho em enxertos-prontos, após enraizamento em viveiro. Médias referentes a: 60 plantas de 1103P, com origem em quatro viveiros; 40 plantas 110R, com origem em dois viveiros e 20 plantas 99R, oriundas de dois viveiristas.

Não foi possível, nesta fase de prospecção, seleccionar enxertos-prontos com iguais combinações casta/porta-enxerto e como o objectivo deste trabalho tinha como alvo fungos do solo *Ilyonectria*, a questão da casta não foi considerada prioritária, uma vez que resultados obtidos por outros autores indicavam baixa incidência destes fungos em castas (Rego, 2004).

Ainda assim, os resultados obtidos para a região de enxertia (Fig. 3.2) podem ter contribuição de fungos existentes no garfo, pelo que se considerou importante apresentar também os resultados obtidos para isolamentos efectuados acima daquela região, ao nível da casta, considerando cada um dos porta-enxertos: 1103P (Fig. 3.3), 110R (Fig. 3.4) e 99R (Fig. 3.5).

Ao nível da casta, não foram detectados fungos *Ilyonectria* spp. em Touriga Franca, enxertada em 1103P, registando-se para as restantes castas uma incidência média de 10% e confirmando-se a maior incidência destes fungos ao nível do porta-enxerto.

Ainda no que se refere à incidência de fungos nas castas enxertadas em 1103P, em nenhuma amostra foi detectado o agente causal da doença de Petri (*Pa. chlamydospora*), o que é positivo, visto ser um dos fungos também envolvidos no declínio das vinhas jovens. No entanto, estes fungos caracterizam-se por um crescimento muito lento em meio de cultura (2-3 semanas), sendo as colónias ultrapassadas com frequência pelas de outros fungos de crescimento rápido, que se sobrepõem às primeiras, levando, por vezes, ao registo de resultados falsos negativos (Aroca e Raposo, 2007).

Regista-se ainda a elevada incidência de fungos Botryosphaeriaceae na casta Touriga Nacional e a incidência nula dos mesmo em Alicante Bouschet.

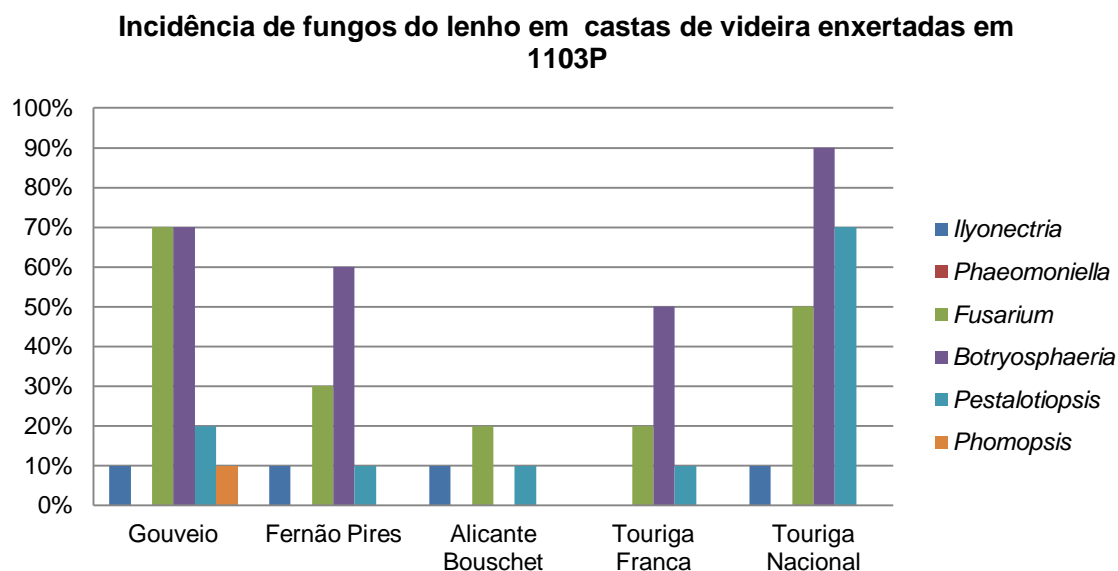


Fig. 3.3. Incidência (%) de fungos de lenho na região acima da enxertia (casta), após enraizamento em viveiro. Médias referentes a 10 plantas de cada casta enxertadas em 1103P, com origem em quatro viveiristas.

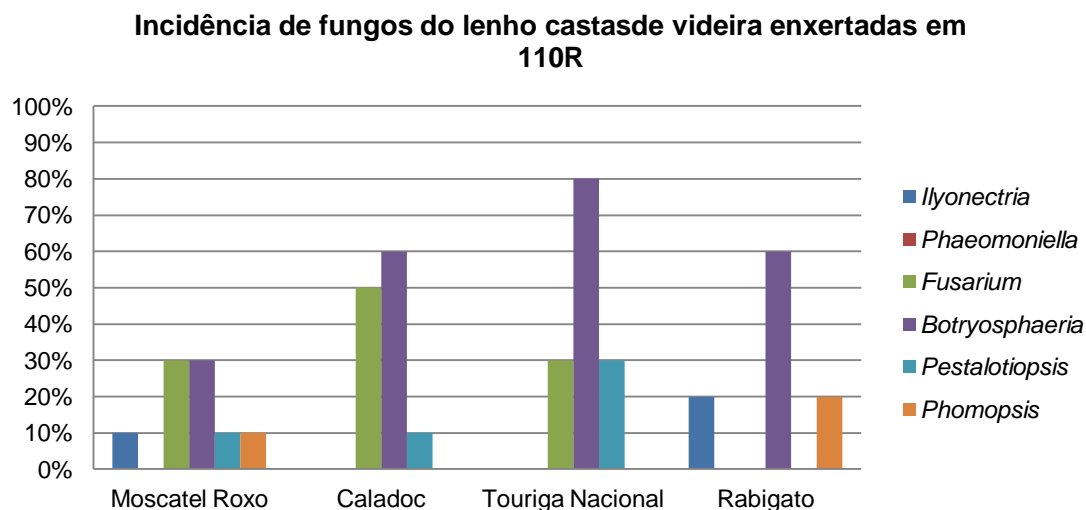


Fig. 3.4. Incidência (%) de fungos de lenho na região acima da enxertia (casta), após enraizamento em viveiro. Médias referentes a 10 plantas de cada casta enxertadas em 110R, com origem em dois viveiristas.

Embora a amostra relativa a materiais enxertados em 99R seja mais restrita, os dados são, ainda assim, apresentados (Fig. 3.5). Destaca-se a incidência de 30% de fungos *Ilyonectria* spp. para a casta Jaen, que em termos absolutos foi a mais elevada que se detectou a nível de casta, em enxertos-prontos. Também é de assinalar a elevada incidência de fungos Botryosphaeriaceae na casta Aragonez. Quer a casta Aragonez quer a casta Touriga Nacional são conhecidas pela sua susceptibilidade a fungos desta família.

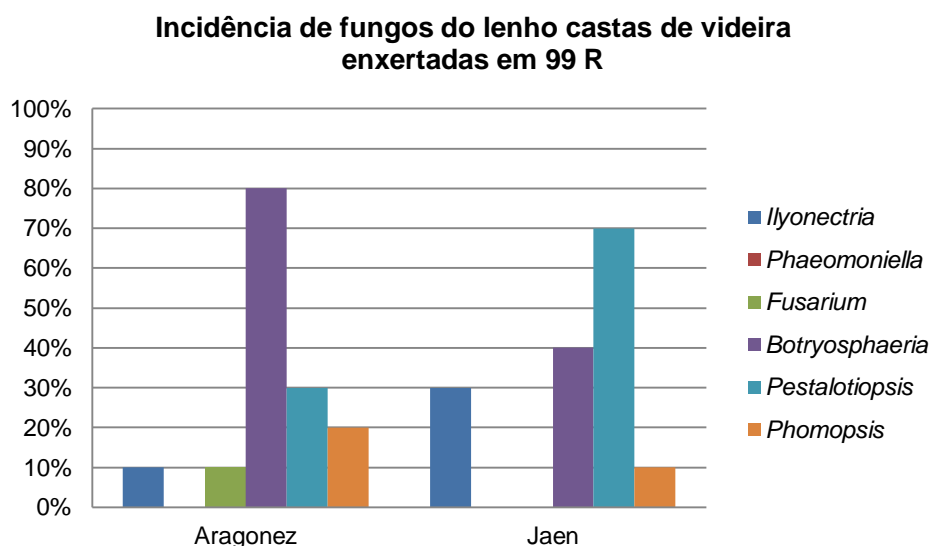


Fig. 3.5. Incidência (%) de fungos de lenho na região acima da enxertia (casta), após enraizamento em viveiro. Médias referentes a 10 plantas de cada casta enxertadas em 110R, com origem em dois viveiristas.

Ao nível do porta-enxerto, os resultados obtidos são comparáveis aos de outros estudos efectuados anteriormente (Rego, 2004), em que se destacam os seguintes aspectos:

- por norma, verifica-se maior incidência dos fungos *Ilyonectria*, agentes causais do pé-negro da videira na região basal do porta-enxerto, diminuindo essa incidência da base para o topo do porta-enxerto;
- a incidência do agente causal da doença de Petri (*Pa. chlamydospora*) foi nula em materiais enraizados;
- a incidência de fungos Botryosphaeriaceae na base do porta-enxerto é em regra baixa, aumentando de incidência da base para o topo do porta-enxerto.

Ao nível da casta, são igualmente comparáveis a outros realizados (Rego, 2004), no que se refere à elevada incidência de fungos Botryosphaeriaceae e à menor incidência de *Ilyonectria* spp.

3.1.3. Caso de estudo: casta Touriga Nacional X porta-enxerto 110R

Acompanharam-se as diferentes fases do processo de produção de enxertos prontos, desde a colheita de varas nos campos de pés-mãe até ao arranque dos enxertos-prontos, após enraizamento em viveiro vitícola. Neste acompanhamento seleccionou-se como caso de estudo a combinação casta/porta-enxerto Touriga Nacional/110R, por se saber, à partida, serem provenientes de campos que vinham revelando problemas de doenças do lenho da videira.

A análise microbiológica de estacas do porta-enxerto 110R revelou incidência idêntica de fungos dos géneros *Ilyonectria*, *Botryosphaeria* e *Pestalotiopsis* (40%) e ainda incidência apreciável (20%) de fungos dos géneros *Phaeomoniella* e *Phomopsis* (Fig. 3.6). Por sua vez, a análise de varas da casta Touriga Nacional detectou maioritariamente a presença de fungos Botryosphaeriaceae (100%), seguida pela presença de fungos dos géneros *Ilyonectria* (40%), *Phomopsis* e *Pestalotiopsis* (Fig. 3.6).

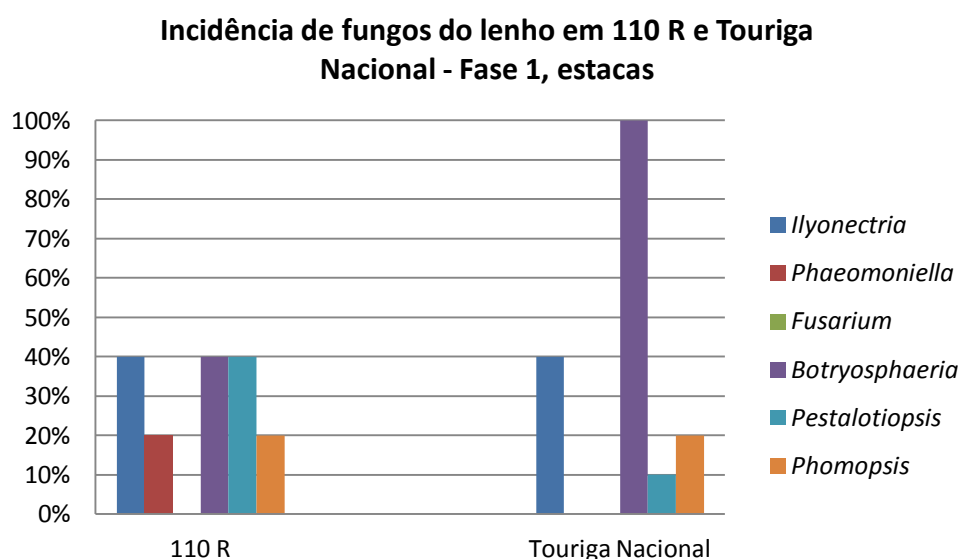


Fig. 3.6. Incidência (%) de fungos de lenho em materiais de propagação vegetativa (estacas) destinados à enxertia do porta-enxerto 110R e da casta Touriga Nacional.

Os valores de incidência para a maioria dos fungos detectados, embora elevados, eram esperados, com excepção dos do género *Ilyonectria*. Resultados obtidos anteriormente (Rego *et al.*, 2001a; Oliveira *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005) provaram a elevada incidência, entre outros, de fungos Botryosphaeriaceae, a partir de varas de porta-enxertos e de castas (Rego, 2004), embora a presença de *Ilyonectria* e de *Phaeomoniella* nestes materiais tenha sido baixa. Também resultados idênticos foram obtidos na África do Sul, onde os fungos

Ilyonectria foram detectados em baixa percentagem, a partir de varas de plantas-mãe de porta-enxertos (Fourie & Halleen, 2002b).

Poucos estudos têm sido efectuados até à data sobre a incidência de *Ilyonectria* spp. em varas de castas de *Vitis vinifera*, o que se compreende, pois estes fungos têm sido encarados como fungos do solo e, por consequência, sem eventual disseminação aérea conhecida. Contudo, o ciclo biológico destes fungos está ainda pouco estudado e a sua elevada incidência em órgãos aéreos da videira pode resultar duma alteração do ciclo de vida de algumas espécies deste género. Estes fungos são conhecidos por formarem peritecas férteis e por produzirem ascósporos viáveis *in vitro* (Rego *et al.*, 2003; Halleen *et al.*, 2006b; Cabral *et al.*, 2011a, 2011b) e existem também relatos da sua ocorrência na natureza (Larignon, 1999). Contudo, a contribuição do estado sexuado do fungo no ciclo da doença está pouco esclarecida. Caso as peritecas se diferenciem, poderão ocorrer infecções dos órgãos aéreos da videira, através de ascósporos, p. ex. a partir de feridas da poda. Também não é impossível que conídios produzidos em madeira doente, ou morta, existente na vinha e/ou no solo sejam dispersos por via aérea. Existem diversos exemplos de fungos de solo com disseminação aérea bem conhecida, como é o caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, agente causal da necrose do colo e da podridão das raízes do tomateiro. Este fungo forma conídios sobre os caules das plantas doentes e, através destes, é assegurada a sua disseminação por via aérea (Rowe *et al.*, 1977; Jarvis, 1988). Também *Phaeocaremonium aleophilum* tem sido isolado do solo (Rooney *et al.*, 2001; Gubler *et al.*, 2004), tal como *Pa. chlamydospora* (Whiteman *et al.*, 2002), apesar de ambas as espécies apresentarem um elevado potencial de disseminação aérea.

Estacas das mesmas vinhas-mãe foram usadas no processo de enxertia, mas antes o material foi desinfectado por imersão em água contendo um corrector de carência de cobre. Este produto, ao dosear cobre, apresenta efeito fungicida e bacteriostático. Após a enxertia, e tal como descrito no Capítulo 1 (1.2.2), os materiais enxertados passam pelo processo de estratificação, em turfa estéril, sob condições de temperatura de 30-32°C e humidade relativa de 90%, durante 10 a 12 dias. Embora esta gama de temperaturas esteja um pouco acima da óptima para o crescimento da maioria dos fungos, algumas espécies de *Ilyonectria* e particularmente fungos *Botryosphaeriaceae* têm a capacidade de se desenvolver a estas temperaturas.

Como resultado do processo de estratificação e muito provavelmente da desinfecção efectuada às estacas antes da enxertia, verifica-se, no final deste procedimento, diminuição da incidência de *Ilyonectria* e de *Phaeomoniella*, ao contrário do ocorrido para os fungos *Botryosphaeriaceae* (Fig. 3.7). Este facto pode indicar, por um lado, menor eficácia do desinfectante em relação a estes fungos, mas muito provavelmente uma maior capacidade

de proliferação de Botryosphaeriaceae nas condições ambientais em que se processa a estratificação, com a eventual contaminação de materiais inicialmente sãos.

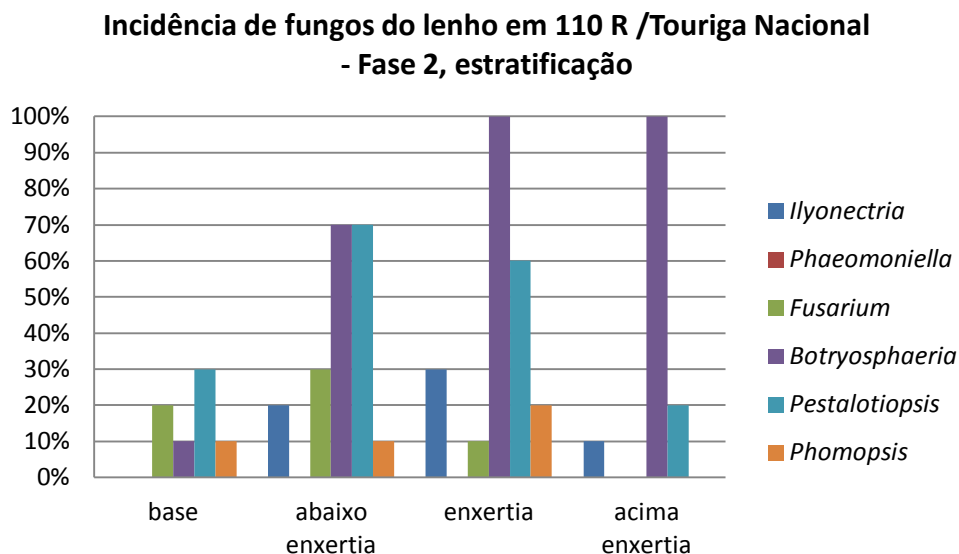


Fig. 3.7. Incidência (%) de fungos de lenho na combinação 110 R X Touriga Nacional, no final do processo de estratificação, considerando quatro locais distintos de isolamento, ao longo das plantas.

À saída do armazém, as plantas acima referidas, com destino ao viveiro onde irão enraizar, estão isentas na região basal dos principais fungos que originam o declínio das vinhas jovens: *Ilyonectria* spp. e *Pa. chlamydospora*. Este aspecto é muito importante, pois pode desde logo determinar o sucesso/insucesso do enraizamento e, em caso de insucesso, a perda imediata de elevado número de plantas que não chega sequer a desenvolver raízes.

Decorrido o período de enraizamento, em solo de viveiro, uma nova amostra de Touriga Nacional/110 R foi analisada e verificou-se que 20% das plantas haviam contraído infecções causadas por *Ilyonectria* spp., na região basal (Fig. 3.8). Ainda assim, o número de plantas infectadas pelos agentes causais do pé-negro foi inferior ao inicialmente registado nas estacas das planta-mãe, quer de garfos quer de porta-enxertos. Ao longo do processo, os materiais permaneceram isentos de *Pa. chlamydospora*, agente causal da doença de Petri, facto digno de realce, já que as estacas dos pés-mãe do porta-enxerto denotaram infecção por este fungo.

Noutros países, ao contrário de Portugal, as infecções por *Pa. chlamydospora* nos materiais enraizados em viveiro chegam a atingir 80% (Bertelli *et al.*, 1998), mas sabe-se que essas infecções se vão incrementando, desde a colheita de estacas nas plantas-mãe e ao longo de todas as operações realizadas em armazém (Aroca *et al.*, 2010). A contribuição do solo de viveiro para a infecção parece ser menos importante.

Retief *et al.* (2007), na África do Sul, utilizando técnicas de biologia molecular, nested-PCR, identificaram *Pa. chlamydospora* nas varas colhidas em plantas-mãe de porta-enxertos (25%), nas estacas de porta-enxertos (42%) e de garfos (16%) destinadas à enxertia, nos tanques de hidratação (40%), em amostras de água colhida durante a enxertia (67%), em substrato destinado à estratificação (8%) e em solo colhido nos campos de pés-mãe de porta-enxertos (17%). Todavia, não detectaram o fungo em amostras de solo de viveiro, antes da plantação.

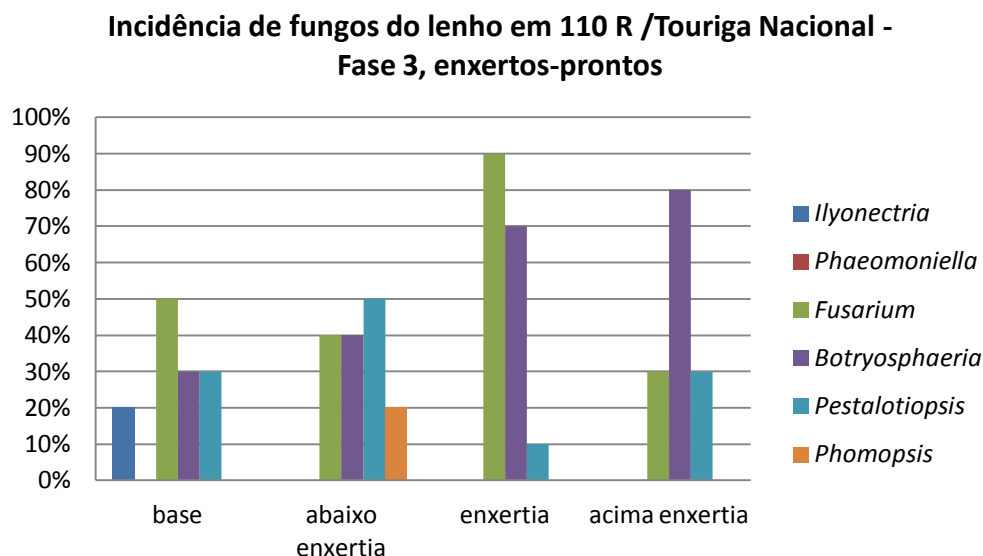


Fig. 3.8. Incidência (%) de fungos de lenho na combinação 110 R X Touriga Nacional, no final do processo de enraizamento em viveiro, ao ar livre, considerando quatro locais distintos de isolamento, ao longo das plantas.

Ainda em relação a *Pa. chlamydospora*, na África do Sul, as infecções agravaram-se durante as operações em armazém, facto que não parece ter acontecido no presente estudo, embora as técnicas de detecção adoptadas por Retief *et al.* (2006) tenham sido de natureza molecular e, por isso, não sejam absolutamente comparáveis às que aqui se apresentam.

Comparando ainda as práticas utilizadas na África do Sul e noutros países, com as usadas em Portugal, a principal diferença reside nas condições de estratificação. Em Portugal esta é conduzida a temperaturas substancialmente mais elevadas do que noutros países e numa gama pouco favorável a *Pa. chlamydospora*. É provável que 10-12 dias à temperatura constante de 30-32°C exerça um efeito desfavorável sobre *Pa. chlamydospora*, que apresenta uma temperatura máxima de crescimento inferior a 35°C (Crous & Gams, 2000). Já condições de estratificação que se aproximem do óptimo de crescimento deste fungo

(25°C), como é o caso de Espanha, poderão contribuir para o aumento das infecções em armazém (Gramaje & Armengol, 2011).

3.2 Detecção de fungos *Ilyonectria* e “*Cylindrocarpon*” noutras matrizes por isolamento microbiológico

3.2.1. Solo

A análise de solos incidiu em parcelas onde estavam implantados os campos de pés-mãe dos porta-enxertos 110R e 1103P, vinhas-mãe das castas Touriga Nacional e Aragonez, solos anteriores à plantação de viveiro (em rotação) e durante o enraizamento em viveiro, com diferentes combinações casta/porta-enxerto.

Nos isolamentos microbiológicos de solo, em meio semi-selectivo, identificaram-se fungos do género *Ilyonectria* para alguns dos solos (Quadro 3.7).

Em solos de vinhas-mãe de porta-enxertos, apenas foram detectados *Ilyonectria* spp./*Cylindrocarpon* spp. para um dos campos do porta-enxerto 1103P. No caso dos solos provenientes de vinhas-mãe de garfos, *Ilyonectria* spp./*Cylindrocarpon* spp. foram identificadas tanto para o solo proveniente da vinha-mãe de garfos da casta Touriga Nacional como da casta Aragonez. No que se refere a solos provenientes de parcelas, antes da instalação de viveiro, de entre os seis solos analisados apenas em quatro solos se verificou a presença de *Ilyonectria* spp./ *Cylindrocarpon* spp. Nos solos provenientes de parcelas durante a plantação em viveiro, não se verificou incidência do fungo para nenhum dos dois solos analisados. Em solos provenientes de parcelas de viveiro durante o enraizamento das estacas enxertadas, de entre os nove solos analisados, apenas se verificou a incidência do fungo para três dos solos (Quadro 3.7).

Para além de fungos *Ilyonectria*/ *Cylindrocarpon*, foram também detectados outros fungos que não foram identificados por se encontrarem fora do âmbito deste trabalho, assim como leveduras e bactérias várias.

3.2.2. Substrato e Águas

Através dos isolamentos microbiológicos realizados com substrato colhido antes e depois da sua utilização no processo de estratificação, não se verificou o aparecimento de *Ilyonectria* spp./ *Cylindrocarpon* spp.

Também as análises microbiológicas realizadas para a água do furo e para as águas dos tanques de hidratação revelaram a ausência de fungos daqueles géneros, tendo-se verificado uma forte colonização das placas de isolamento por bactérias e leveduras.

3.2.3. Atmosfera das câmaras de frio e dos armazéns

A monitorização do ar nas câmaras e nos armazéns permitiu detectar a presença de *Ilyonectria* spp. em apenas uma das sete amostras colhidas, ao longo de quatro meses. A detecção positiva correspondeu a uma câmara onde estavam armazenadas varas de castas e estacas de porta-enxertos (Anexo B). Estes resultados podem levantar a hipótese de que, tal como discutido no ponto 3.1.3., *Ilyonectria* spp., à semelhança de *Pa. chlamydospora* ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, possam disseminar-se também por via aérea.

3.2.4. Instrumentos de corte

Os resultados confirmam a presença de fungos do género *Ilyonectria* spp. em instrumentos de corte, tesouras e lâminas das máquinas de enxertia, utilizados em viveiros. Os fungos deste género encontravam-se presentes em tesouras de segmentação de estacas de porta-enxertos, não se verificando a sua presença em tesouras utilizadas na segmentação de garfos, em lâminas das máquinas de enxertar, nem em tesouras de poda de enxertos-prontos utilizadas na fase de preparação das plantas para comercialização (Quadro 3.1).

Quadro 3.1. Detecção de espécies de *Ilyonectria* em amostras recolhidas a partir de instrumentos de corte em várias fases do processo de propagação de videiras enxertadas em viveiro.

Instrumentos de corte	Nº de amostras	Presença de <i>Ilyonectria</i>
Tesouras de segmentação de garfos	3	0
Tesouras de segmentação de estacas de porta-enxertos	3	2
Lâminas das máquinas de enxertar	17	0
Tesouras de poda de enxertos-prontos	7	0

Estes resultados não se encontram de acordo com o esperado pois, tendo-se verificado a existência de fungos do género *Ilyonectria* em material de propagação, tanto garfos como estacas de porta-enxertos, seria de esperar resultados positivos relativamente às tesouras de poda e às lâminas das máquinas de enxertar. Estes resultados podem ser explicados pelo número reduzido de amostras analisadas. Seria necessário proceder-se à análise dos

instrumentos de corte através de biologia molecular para complementação destes resultados.

3.2.5. Parafina

Através da realização de isolamentos microbiológicos de parafina, não se observou a presença de qualquer fungo, quer antes da sua utilização, quer depois de ser utilizada após fusão a cerca de 70°C, como referido no capítulo 1 (1.2.2).

3.3. Características culturais dos isolados obtidos de *Ilyonectria* e "*Cylindrocarpon*" spp.

As características culturais dos isolados de *Ilyonectria* e "*Cylindrocarpon*" spp. em estudo (Anexo C), observados no meio de cultura PDA, após 12 dias de incubação à temperatura de 20±1°C, na obscuridade, estão descritas no Quadro 3.2, e algumas podem ser observadas na Fig. 3.9.

Através da comparação dos isolados obtidos com as culturas de referência e com bibliografia especializada (Halleen *et al.*, 2006; Schroers *et al.*, 2008; Cabral *et al.* 2011a, 2011b) verificou-se que os isolados, CyMC 38, CyMC 40, CyMC 48, CyMC 49, CyMC 50 e, provenientes da base do porta-enxerto e abaixo da zona de enxertia de enxertos-prontos (Anexo C), possuem características culturais idênticas ao grupo de espécies *Ilyonectria radicola*. Os isolados CyMC 43 e CyMC 44, provenientes da base do porta-enxerto de enxertos-prontos (Anexo C), possuem características culturais semelhantes ao grupo de espécies "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*. Os restantes isolados, provenientes de diferentes solos, ar das câmaras de refrigeração e de diferentes zonas de enxertos-prontos (Anexo C), demonstraram possuir características culturais semelhantes às do complexo de espécies *Ilyonectria macrodidyma*, sendo este complexo predominante, face aos restantes complexos e/ou espécies.

Verificou-se elevada variabilidade de características culturais dos isolados identificados como pertencentes ao complexo *I. macrodidyma*. Recentemente Cabral *et al.* (2011a, 2011b) descreveu diferentes espécies pertencentes a este complexo, que apresentam características distintas.

Quadro 3. 2. Características culturais de 66 isolados de *Ilyonectria* spp. e "*Cylindrocarpon*" spp. em meio PDA e OA ao fim de 12 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 20 ± 1°C

Código atribuído	Face Superior			Frente de crescimento	Aspecto à transparência	Face inferior	
	Aspecto Cultural	Densidade da colónia	Coloração			Zonagem	Coloração
CyMC 48	feltroso	média	PDA: chestnut a rust com micélio buff e afloramentos cinnamon no centro, margem buff	regular	homogénea em PDA	ausente	idem face superior
CyMC 38, CyMC 49, CyMC 50	feltroso	fraca a média	PDA: chestnut com micélio aéreo buff, margem buff	regular	homogénea em PDA	concêntrica em PDA	idem face superior
CyMC 40	feltroso	média	PDA: sepia a cinnamon com micélio buff, margem	regular	homogénea em PDA	ausente	idem face superior
CyMC 43, CyMC 44	feltroso	média	PDA: fulvous a apricot com micélio buff a saffron	irregular	homogénea em PDA	concêntrica	Idem face superior
CyMC 5, CyMC 13, CyMC 14, CyMC 15, CyMC 16, CyMC 17, CyMC 27, CyMC 51	feltroso	média	PDA: Umber com afloramentos buff a luteous OA: margem amber a pure yellow	regular	homogéneo em PDA	ausente	idem face superior excepto na cor (PDA: chestnut)
CyMC 52, CyMC 53, CyMC 63, CyMC 64	feltroso	média	PDA: dark brick a sepia com micélio buff com afloramentos sienna no centro, margem saffron OA: margem amber a pure yellow	regular a irregular	homogénea em PDA	concêntrica	idem face superior excepto cor (PDA: dark cinnamon e sépia em direcção à margem)
CyMC 37, CyMC 39, CyMC 54	feltroso	média	PDA: cinnamon com micélio buff a honey, margem luteous OA: margem amber a pure yellow	regular	homogénea em PDA	ausente	Idem face superior excepto cor (PDA: chestnut)
CyMC 1, CyMC 6, CyMC 18, CyMC 19, CyMC 20, CyMC 21, CyMC 23, CyMC 31, CyMC 34, CyMC 36, CyMC 41, CyMC 42, CyMC 65	feltroso a ligeiramente e contonoso	média	PDA: chestnut com micélio aéreo buff, margem luteous OA: margem amber a pure yellow	regular	homogéneo em PDA	ausente	idem face superior
CyMC 7	feltroso	média	PDA: saffron com micélio buff com afloramentos pale luteous no centro OA: margem amber a pure yellow	irregular	homogénea em PDA	concêntrica em PDA	idem face superior excepto cor (PDA: cinnamon com sectores chestnut)
CyMC 8	feltroso a cotonoso	média	PDA: saffron com micélio aéreo buff, centro com afloramentos pale luteous, margem inexistente	regular a irregular	homogéneo em PDA	ausente	idem face superior excepto cor (PDA: sienna a orange)

Quadro 3.2. Características culturais de 66 isolados de *Ilyonectria* spp. e "*Cylindrocarpon*" spp. em meio PDA e OA ao fim de 12 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 20 ± 1°C (continuação)

Código atribuído	Face Superior		Coloração	Frente de crescimento	Aspecto à transparência	Face inferior	
	Aspecto Cultural	Densidade da colônia				Zonagem	Coloração
CyMC 33, CyMC 55, CyMC 56, CyMC 57, CyMC 58, CyMC 59, CyMC 60	feltroso	média	PDA: cinnamon com micélio saffron a buff, margem saffron OA: margem amber a pure yellow	regular	homogénea em PDA	concêntrica	idem face superior excepto cor (PDA: dark cinnamon e sépia em direcção à margem)
CyMC 4, CyMC 10, CyMC 25, CyMC 26, CyMC 35, CyMC 45	feltroso	média	PDA: chestnut com micélio aéreo buff, margem luteous OA: margem amber a pure yellow	regular a ligeiramente irregular	homogéneo em PDA	ausente	idem face superior excepto na cor (PDA: sépia a cinnamon)
CyMC 61	feltroso	média	PDA: fluvous a apricot com micélio honey a isabelline e buff, margem luteous OA: margem amber a pure yellow	regular	homogénea em PDA	ligeira zonagem concêntrica	Idem face superior excepto cor (PDA: chestnut e fulvous em direcção à margem)
CyMC 11	feltroso a cotonoso	média	PDA: saffron com micélio aéreo buff, margem ochreous OA: margem amber a pure yellow	regular	homogénea em PDA	ausente	idem face superior excepto cor (PDA: fulvous a ochreous)
CyMC 12, CyMC 22, CyMC 28, CyMC 29, CyMC 32, CyMC 62	feltroso	média	PDA: chestnut com micélio aéreo saffron, margem luteous OA: margem amber a pure yellow	regular	homogéneo em PDA	ausente	idem face superior
CyMC 66	feltroso	média	PDA: fulvous a ochreous com micélio buff a pale luteous no centro, margem saffron OA: margem amber a pure yellow	regular	homogénea em PDA	concêntrica em PDA	idem face superior excepto cor (PDA: light chestnut no centro e cinnamon a luteous em direcção à margem)
CyMC 3, CyMC 30, CyMC 46	feltroso	média	PDA: chestnut com micélio aéreo hazel a buff, margem luteous OA: margem amber a pure yellow	regular a ligeiramente irregular	homogéneo em PDA	ausente	idem face superior
CyMC 47	feltroso	média	PDA: chestnut com micélio luteous a sienna, margem luteous OA: margem amber a pure yellow	irregular	homogénea em PDA	ausente	idem face superior

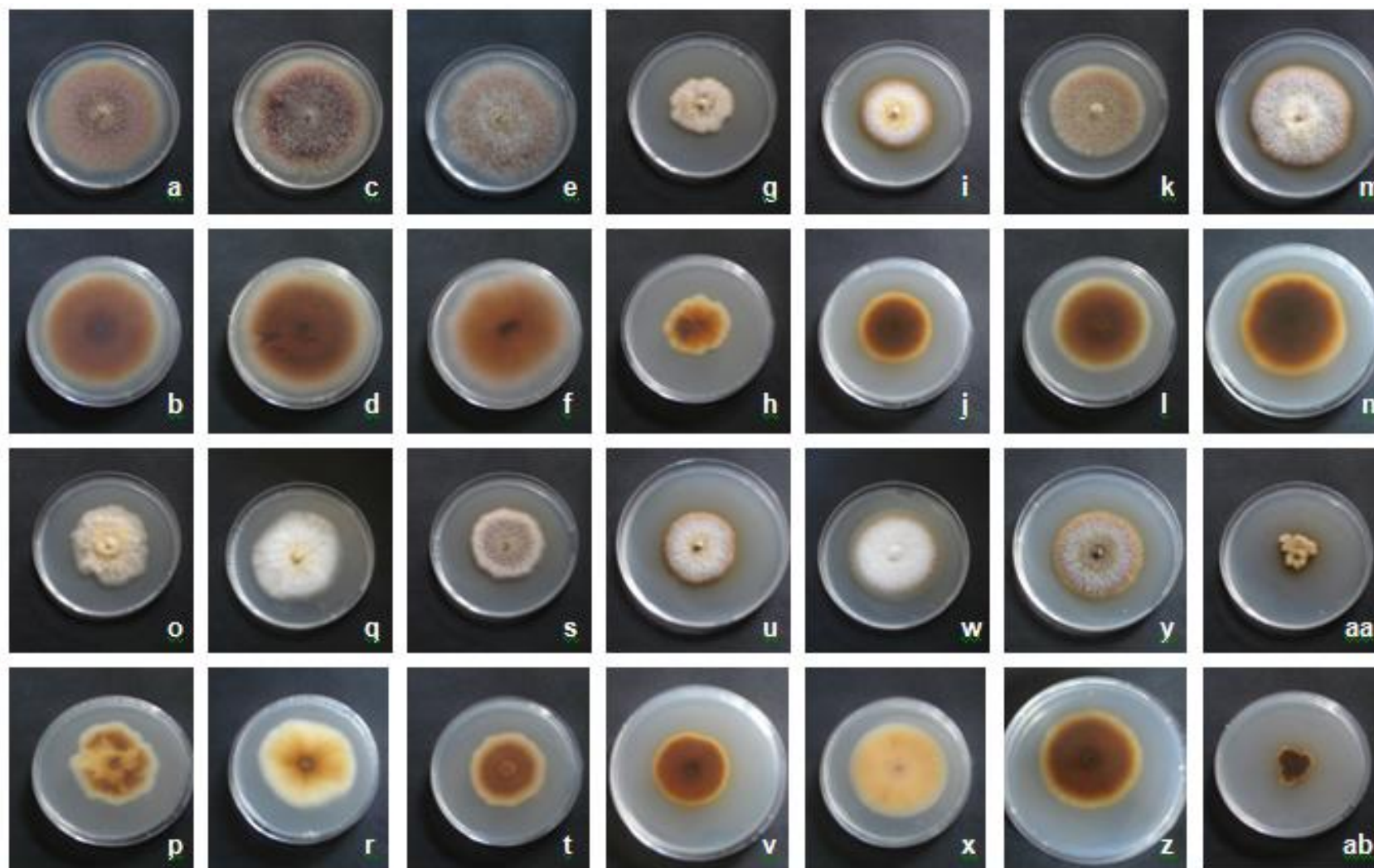


Fig. 3. 9. Culturas de *Ilyonectria* spp. e "*Cylindrocarpon*" spp. em meio PDA ao fim de 12 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Em cima: face superior. Em baixo: face inferior. *I. radicola*: a e b, CyMC 48; c e d, CyMC 50; e e f, CyMC 40. "*C.*" *pauciseptatum*: g e h, CyMC 43. *I. macrodidyma*: i e j, CyMC 27; k e l, CyMC 39; m e n, CyMC 41; o e p, CyMC 7; q e r, CyMC 8; s e t, CyMC 52; u e v, CyMC 4; w e x, CyMC 11; y e z, CyMC 29; aa e ab, CyMC 47.

3.4. Comparação dos métodos clássicos e biomoleculares aplicados à detecção/identificação de *Ilyonectria* e “*Cylindrocarpon*” spp.

3.4.1. Material Vegetal

3.4.1.1. Vinhas-mãe de porta-enxertos e de garfos

A técnica de nested-PCR, utilizando o par de iniciadores Dest1/Dest4 na segunda etapa de amplificação, permitiu identificar apenas fungos do género *Ilyonectria* spp. em estacas dos porta-enxertos 110R e 1103P e em garfos das castas Touriga Nacional e Aragonez. Tal como para os isolamentos microbiológicos, os resultados obtidos a partir de técnicas de biologia molecular foram positivos tanto para estacas de porta-enxertos como de castas. A incidência média de *Ilyonectria* spp. detectada por esta técnica foi superior à detectada por isolamento microbiológico (Quadro 3.3).

Verificou-se uma maior incidência em relação ao porta-enxerto 1103P com a técnica de biologia molecular, contrariamente ao que se verificou nos isolamentos microbiológicos. Quanto às castas, os resultados obtidos por técnicas moleculares estão de acordo com os obtidos nos isolamentos microbiológicos, ou seja, uma maior incidência de *Ilyonectria* spp. para a casta Touriga Nacional, comparativamente à casta Aragonez.

Quadro 3.3. Incidência (%) de *Ilyonectria* spp. em estacas destinadas à enxertia

Método	Porta-enxerto		Casta	
	110R ^a	1103P ^b	Touriga Nacional ^a	Aragonez ^b
Biologia Molecular	66,67	80	50	40
Isolamento microbiológico	40	25	40	20

^a Dados médios obtidos a partir de uma amostra de 10 estacas.

^b Dados médios obtidos a partir de duas amostras de 10 estacas.

A diferença observada entre as duas técnicas utilizadas é explicada pela maior sensibilidade das técnicas moleculares, face às clássicas. No caso dos fungos causadores de declínio das vinhas jovens, existem vários exemplos dessa maior sensibilidade, em relação a *Pa. chlamydospora* (Ridgway *et al.*, 2002; Whiteman *et al.*, 2004; Retief *et al.* 2005) e *Phaeoacremonium* spp. (fungos envolvidos na doença de Petri). Relativamente a estes últimos, a comparação de métodos tradicionais e de PCR permitiu verificar que, usando a mesma quantidade de madeira para isolamento e para extracção de DNA, a técnica PCR permitia sempre detectar maior percentagem de fragmentos de videira infectados, a partir de

uma mesma planta, do que o isolamento microbiológico, com a vantagem de ser uma técnica que permite a obtenção de resultados muito mais rapidamente (Aroca & Raposo, 2007).

No caso dos fungos causadores da doença de Petri, que se caracterizam por crescimento muito lento em meio de cultura (2-3 semanas), as colónias são, com frequência, ultrapassadas pelas de outros fungos de crescimento rápido, que se sobrepõem às primeiras, levando ao registo de resultados falsos negativos (Aroca e Raposo, 2007). Apesar dos fungos dos géneros *Ilyonectria* e "*Cylindrocarpon*" apresentarem crescimento mais rápido, comparativamente a *Phaeoacremonium* e a *Phaeomoniella*, são também ultrapassadas e/ou inibidas pelos fungos Botryosphaeriaceae e por inúmeros saprófitas, pelo que a detecção de falsos negativos também pode ocorrer.

A técnica de nested-PCR, constituída por duas etapas sequenciais de amplificação, tem-se revelado útil quando existem impurezas ou compostos que inibem a amplificação do DNA existente na amostra, ou quando a quantidade de DNA que se deseja detectar é muito baixa (Fungaro, 2000).

No entanto, quando se utilizam as técnicas biomoleculares, baseadas na detecção de DNA, é necessário ter em conta que a presença do DNA do patógeno não confirma a viabilidade deste (Klein & Juneja, 1997). Pelo contrário, as técnicas clássicas de isolamento permitem detectar a presença de um determinado fungo apenas quando existem propágulos viáveis do mesmo, como esporos e/ou micélio. Desta forma, considera-se importante a utilização conjunta das técnicas referidas, pois a sua complementaridade poderá originar resultados mais fiáveis.

3.4.1.2. Enxertos-prontos de videira

Comparando os resultados de incidência média de *Ilyonectria* spp. na zona basal de porta-enxertos obtidos pelo método clássico de isolamento microbiológico com os resultados obtidos por nested-PCR, verifica-se novamente, tal como no ponto anterior (3.4.1.1), uma incidência média superior no caso do método de biologia molecular (Quadro 3.4). A técnica de biologia molecular revelou uma incidência média (60%) de *Ilyonectria* spp. para o porta-enxerto 99R superior ao porta-enxerto 110R (54%), contrariamente aos resultados obtidos nos isolamentos microbiológicos.

Quadro 3.4. Incidência (%) de *Ilyonectria* spp. na zona basal de enxertos-prontos

Método	Enxertos-prontos		
	110R ^a	1103P ^b	99R ^c
Biologia Molecular	53	64	60
Isolamento microbiológico	28	34	15

^a Dados médios obtidos a partir de quatro amostras de 10 plantas.

^b Dados médios obtidos a partir de cinco amostras de 10 plantas.

^c Dados médios obtidos a partir de duas amostras de 10 plantas.

As castas Alicante Bouschet, Gouveio e Fernão Pires, todas elas com iguais incidências médias (10%) de fungos do género *Ilyonectria*, através de técnicas clássicas, revelaram diferentes incidências nos resultados obtidos em biologia molecular (Quadro 3.5). No caso da casta Touriga Franca, a partir de isolamentos microbiológicos não se verificou incidência de fungos do género *Ilyonectria*, no entanto por biologia molecular a incidência média foi de 60%, tornando-a na casta enxertada em 1103P com maior nível de incidência, seguidamente à casta Alicante Bouschet (Quadro 3.5).

Ao nível das castas enxertadas nos porta-enxertos 110R e 99R (Quadro 3.5) verificou-se também que a incidência determinada por biologia molecular se manifestou superior, revelando-se bastante superior na casta Rabigato, enxertada em 110R, uma vez que para todas as amostras se obteve uma banda característica de cerca de 399-400 pb, por nested-PCR (Fig. 3.10). Através de biologia molecular verificou-se também incidência em castas para as quais não se tinham detectado fungos do género *Ilyonectria* pelo método clássico de isolamento, nomeadamente para as castas Touriga Nacional e Caladoc enxertadas em 110R (Quadro 3.5).

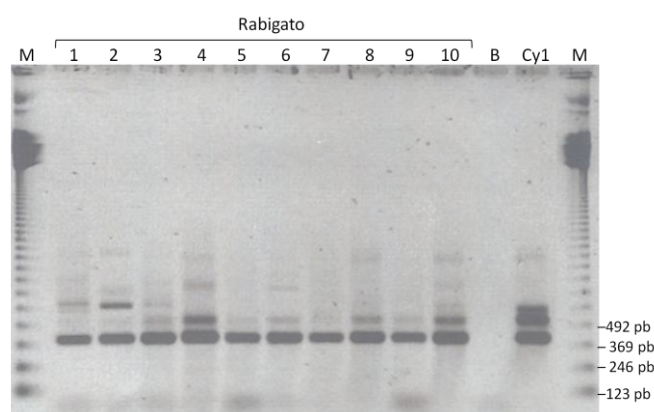


Fig. 3. 10. Produtos de amplificação por nested-PCR, em gel de agarose 1,2%, utilizando um par de iniciadores específicos Dest1/Dest4 para o género *Ilyonectria* e "*Cylindrocarpon*" para a região acima da enxertia de 10 videiras de Rabigato enxertadas em 110R. M - marcador molecular 123 bp (InvitrogenTM, Life Technologies); B - controlo negativo; Cy1 - isolado de *Ilyonectria liriodendri*.

Quadro 3.5. Incidência média (%) de *Ilyonectria* spp. na região acima da enxertia (casta) de videiras enxertadas em 1103P, 110R e 99R

Porta enxerto	Casta	Método de Detecção	
		Isolamentos microbiológicos	nested-PCR
1103P	Alicante Bouschet	10,0	70,0
	Gouveio	10,0	20,0
	Fernão Pires	10,0	33,3
	Touriga Franca	0,0	60,0
110R	Moscatel Roxo	10,0	12,5
	Rabigato	20,0	100,0
	Touriga Nacional	0,0	12,5
	Caladoc	0,0	10,0
99R	Aragonez	10,0	11,1
	Jaen	30,0	50,0

As diferenças de valores médios de incidência, existentes entre métodos utilizados, traduzem-se mais uma vez pelas razões já apresentadas anteriormente.

3.4.1.3. Caso de estudo: casta Touriga Nacional/porta-enxerto 110 R

Os valores de incidência de *Ilyonectria* spp., obtidos por métodos moleculares, para as estacas de 110R e para os garfos de Touriga Nacional revelaram-se novamente superiores aos valores obtidos por isolamentos clássicos (Quadro 3.6). Nestes, a incidência havia sido idêntica ao nível do porta-enxerto e da casta (40%).

Quadro 3.6. Incidência média (%) de *Ilyonectria* spp. em materiais de propagação vegetativa Touriga Nacional/110R, ao longo das diferentes fases do processo de obtenção de enxertos-prontos

Fase do processo	Nível	Método de Detecção	
		Isolamento microbiológico	nested-PCR
Estacas de 110R	Base	40,0	66,7
	Acima da enxertia	nd.	nd.
Garfos de Touriga Nacional	Base	40,0	50,0
	Acima da enxertia	nd.	nd.
Após estratificação	Base	0,0	100,0
	Acima da enxertia	10,0	nd
Após enraizamento	Base	20,0	30,0
	Acima da enxertia	0,0	12,5

nd. - não determinado

Decorrido o período de estratificação, e para a base do porta-enxerto, os resultados obtidos por biologia molecular revelam a presença de *Ilyonectria* em todas as plantas analisadas (100%), em oposição à ausência de detecção por isolamento microbiológico (Quadro 3.6). Conforme referido anteriormente, a técnica PCR permite detectar tanto o DNA de células viáveis como o de células não viáveis. Assim, é provável que fungos *Ilyonectria*, inactivados pela aplicação do produto cúprico às águas dos tanques de hidratação, aliado à exposição às elevadas temperaturas a que as plantas estão sujeitas durante a fase de estratificação, estejam a ser detectados por análise molecular.

Após a fase de enraizamento das plantas em viveiro, detectaram-se por métodos biomoleculares 30% de plantas infectadas ao nível da base do porta-enxerto, valor ligeiramente superior ao detectado por métodos microbiológicos. Este valor representa um decréscimo relativamente à fase de estratificação, o que é pouco provável, uma vez que está largamente documentado que as plantas readquirem os fungos *Ilyonectria* durante o processo de enraizamento, a partir de inóculo existente no solo (Oliveira *et al.*, 2003; Rego, 2004, Halleen *et al.*, 2006a).

Ainda através de métodos biomoleculares foi possível a detecção de *Ilyonectria* spp., acima da enxertia, ao contrário do que aconteceu com o método clássico de isolamento. Ambos os métodos se encontram em concordância ao revelarem maior incidência dos agentes causais do pé-negro na região basal do porta-enxerto.

3.4.2. Solo

Através da técnica nested-PCR, utilizando-se os iniciadores Dest1 e Dest4, verificou-se a presença de fungos do género *Ilyonectria* em todos os solos de viveiro analisados (Quadro 3.7), através da detecção de uma banda característica de 399-400 pb. Estes resultados estão em concordância com dados obtidos em trabalhos anteriores, que indicam a presença de fungos do género *Ilyonectria* em solos de viveiro vitícola e a sua contribuição, como uma das principais fontes de inóculo, no ciclo da doença (Damm & Fourie, 2005).

A detecção molecular de outros fungos associados a material de viveiro vitícola e em particular a partir do solo, nomeadamente *Pa. chlamydospora*, é já conhecida. Num estudo efectuado por Retief *et al.* (2007), verificou-se a presença deste fungo em 17% das amostras colhidas em solos provenientes de campos de pés-mãe de porta-enxertos, não se verificando para nenhuma das amostras colhidas de parcelas imediatamente antes da plantação de viveiro. Já no que se refere à detecção molecular de *Ilyonectria* spp., a partir de solo de viveiro vitícola, os estudos realizados até à data são muito restritos, apenas se conhecendo os trabalhos de Damm & Fourie (2005) e Mostert *et al.* (2010).

No presente estudo, e tal como seria de esperar, a utilização de técnicas biomoleculares conduziu à detecção de fungos do género *Ilyonectria* para um maior número de amostras de solo, comparativamente à obtida para as técnicas clássicas de isolamento. Esta diferença de resultados deve-se ao facto dos fungos em estudo poderem ser ocultados/inibidos nas placas de isolamento, por outros de crescimento mais rápido, tal como referido anteriormente em relação a isolamentos de material vegetal.

Também o reduzido número de repetições por diluição (três repetições por diluição) e a baixa quantidade de DNA do fungo alvo, presente em cada amostra, reduzem a probabilidade do mesmo vir a ser detectado, através de técnicas clássicas. Mais uma vez, tal como nos pontos anteriores, verifica-se uma maior sensibilidade da técnica de biologia molecular em relação à técnica clássica.

Os iniciadores Dest1/Dest4, utilizados na segunda amplificação de nested-PCR permitem identificar fungos *Ilyonectria*, apenas ao nível do género. Tal facto levou à necessidade de efectuar uma amplificação com os pares de iniciadores Lir1/Lir2, Mac1/MaPa2 e Pau1/MaPa2, usados numa reacção Multiplex, com o objectivo de determinar as espécies de *Ilyonectria* presentes em cada solo, respectivamente, *I. liriodendri*, *I. macrodidyma* e "*C.*" *pauciseptatum*. As duas primeiras espécies são consideradas por inúmeros autores como as principais responsáveis pela doença do pé negro da videira, enquanto para a última subsistiam algumas dúvidas sobre o seu envolvimento na doença. Recentemente, Tewoldemedhin *et al.* (2011) provaram a patogenicidade de alguns isolados de "*C.*" *pauciseptatum*, em relação à macieira e a sua responsabilidade, a par de outras espécies de *Ilyonectria*, na doença de replantação. Também Martín *et al.* (2011) provaram a patogenicidade de isolados desta espécie, em relação à videira, colocando-a definitivamente na lista de agentes causais do pé-negro.

Ainda relativamente à análise de solos, os produtos de amplificação obtidos (Fig. 3.11, Quadro 3.7) demonstraram que, em solos onde estão instalados pés-mãe de porta-enxertos (solos 1, 2 e 3) estava apenas presente a espécie *I. macrodidyma*, em solos de vinhas-mãe de garfos (solos 4 e 5) e em solos anteriores à plantação (solos 5 a 11), para além de *I. macrodidyma* estava igualmente presente *I. liriodendri*. Em solos de viveiro, durante a plantação (solos 12 e 13) e após o enraizamento das videiras enxertadas em viveiro (solos 14 a 22, excepto solo 21) a população de *Ilyonectria* estava maioritariamente representada pelas espécies *I. macrodidyma* e *I. liriodendri*, surgindo "*C.*" *pauciseptatum* em quatro solos (12, 14, 19 e 20). No solo 21, apesar de se terem observado produtos de amplificação por nested-PCR, as espécies existentes não corresponderam a *I. liriodendri*, *I. macrodidyma* ou "*C.*" *pauciseptatum*, daí a ausência das bandas respectivas por Multiplex nested-PCR (Fig. 3.11).

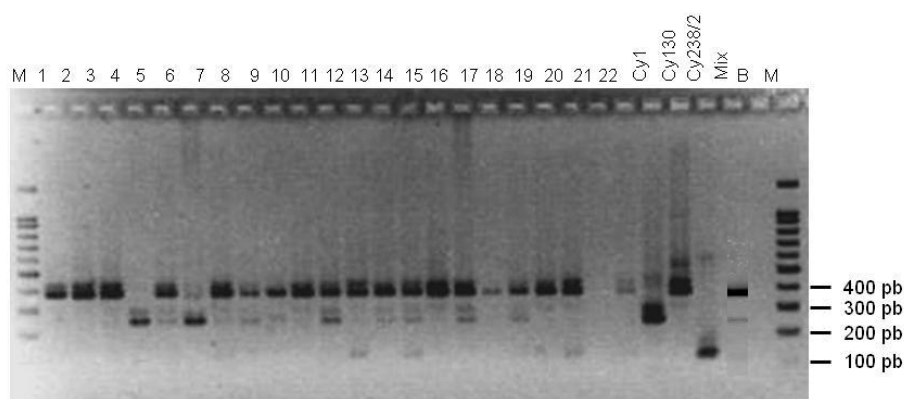


Fig. 3. 11. Produtos de amplificação por Multiplex nested-PCR, em gel de agarose 2%, utilizando três pares de iniciadores específicos Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2 e Pau1/MaPa2 para as espécies *Ilyonectria macrodidyma*, *Ilyonectria liriodendri* e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* respectivamente, para os solos 1 a 22. M - marcador molecular 100 bp (Bioron international, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha); B - controlo negativo; Cy1 - isolado de *Ilyonectria liriodendri*; Cy 130 - isolado de *Ilyonectria macrodidyma*; Cy 238/2 - isolado de "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*; Mix - junção dos isolados Cy1, Cy 130 e Cy 238/2.

Quadro 3. 7. Presença/ausência de fungos do género *Ilyonectria* em diferentes solos, ao longo das várias fases de produção de enxertos-prontos.

Solo	Fase do processo	<i>Ilyonectria</i> spp.		
		Isolamento Microbiológico	nested-PCR	Espécie Multiplex nested-PCR
1	Pés-mãe de porta-enxertos 110R	-	+	<i>I. macrodidyma</i>
2	Pés-mãe de porta-enxertos 1103P	+	+	<i>I. macrodidyma</i>
3	Pés-mãe de porta-enxertos 1103P	-	+	<i>I. macrodidyma</i>
4	Vinhas-mãe de Touriga Nacional	+	+	<i>I. liriodendri</i>
5	Vinhas-mãe de Aragonez	+	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i>
6	Antes da plantação de enxertos prontos	+	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i>
7	Antes da plantação de enxertos prontos	+	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i>
8	Antes da plantação de enxertos prontos	+	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i>
9	Antes da plantação de enxertos prontos	+	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i>
10	Antes da plantação de enxertos prontos	-	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i>

Quadro 3. 7. Presença/ausência de fungos do género *Ilyonectria* em diferentes solos, ao longo das várias fases de produção de enxertos-prontos (continuação).

Solo	Fase do processo	<i>Ilyonectria</i> spp.		
		Isolamento Microbiológico	nested-PCR	Espécie Multiplex nested-PCR
11	Antes da plantação de enxertos prontos	-	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i>
12	Durante a plantação	-	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i> "C". <i>pauciseptatum</i>
13	Durante a plantação	-	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i>
14	Após enraizamento de enxertos-prontos	-	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i> "C". <i>pauciseptatum</i>
15	Após enraizamento de enxertos-prontos	-	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i>
16	Após enraizamento de enxertos-prontos	+	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i>
17	Após enraizamento de enxertos-prontos	-	+	<i>I. macrodidyma</i>
18	Após enraizamento de enxertos-prontos	-	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i>
19	Após enraizamento de enxertos-prontos	+	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i> "C". <i>pauciseptatum</i>
20	Após enraizamento de enxertos-prontos	+	+	<i>I. macrodidyma</i> <i>I. liriodendri</i> "C". <i>pauciseptatum</i>
21	Após enraizamento de enxertos-prontos	+	-	-
22	Após enraizamento de enxertos-prontos	+	-	<i>I. macrodidyma</i>

Provou-se a ubiquidade de *Ilyonectria* spp. em solos vitícolas, mas os métodos utilizados não permitem que se retirem conclusões sobre a concentração de inóculo existente no solo, nem sobre a sua real viabilidade. Nestas circunstâncias, o método clássico tende a aproximar-se mais da realidade, uma vez que os isolados obtidos provieram de esporos e/ou micélio viáveis, ainda que se saiba que o limiar de detecção deste método é inferior ao obtido por análise molecular.

Com vista a proceder-se a uma análise mais detalhada dos resultados, obteve-se informação de um estudo realizado por Ana Cabral (*comunicação pessoal*), no âmbito do

seu trabalho de doutoramento, relativamente à quantificação de inóculo nalguns destes solos, por PCR quantitativo, qPCR.

Embora o método de extracção de DNA usado por A. Cabral não seja coincidente com o realizado no presente estudo, os resultados permitem verificar que a concentração de DNA presente nos diversos solos é bastante variável (Quadro 3.8). Do conjunto de resultados obtidos, neste e no trabalho de A. Cabral, existe uma discrepância referente ao solo 7 pois, conforme se pode verificar (Quadro 3.8), quer as técnicas clássicas quer as moleculares conduziram à detecção/identificação de *I. liriodendri* e *I. macrodidyma* neste solo, enquanto a análise por qPCR aponta para a inexistência de *Ilyonectria* spp. (Quadro 3.8).

Quadro 3. 8. Concentração de DNA de *Ilyonectria* spp. em solos de vinhas-mãe de porta-enxertos e de garfos, solos em rotação e solos de viveiro vitícola

Solo	Cultura Actual	Cultura Anterior	<i>Ilyonectria</i> spp. (ng DNA g ⁻¹ solo)
1	Pés-mãe de porta-enxertos 110R	na.	6,53
2	Pés-mãe de porta-enxertos 1103P	na.	3,75
3	Pés-mãe de porta-enxertos 1103P	na.	1,58
4	Vinhas-mãe de Touriga Nacional	na.	4,92
5	Vinhas-mãe de Aragonez	na.	2,79
6	Couve-brócolo	Azevém	0,09
7	Cenouras	Couve-brócolo	0,00
8	Cenouras	Batata	0,01
9	Batata-doce	Fava	9,89
10	N/d	Couve-brócolo	5,75
11	N/d	Couve-brócolo	2,43
12	Viveiro vitícola	Cenoura	2,43
13	Viveiro vitícola	Batata	7,77
14	Viveiro vitícola	Cebola	2,16
15	Viveiro vitícola	Cebola	2,30
16	Viveiro vitícola	Cenoura	2,78
17	Viveiro vitícola	Sorgo	0,84
18	Viveiro vitícola	Sorgo	0,86
na. - não aplicável		Fonte: Ana Cabral (comunicação pessoal)	

Concentrações elevadas de DNA de *Ilyonectria* spp. foram obtidas para amostras de solo provenientes das vinhas mãe de porta-enxertos e vinhas-mãe de garfos, provavelmente por se tratarem de plantas perenes e, por conseguinte, propiciarem a multiplicação selectiva de agentes patogénicos radiculares da videira, melhor adaptados aos exsudados radiculares deste hospedeiro. Estes valores podem também explicar o facto do material vegetal (varas/estacas) proveniente destas parcelas se encontrar contaminado.

Registaram-se ainda valores muito elevados de concentração de DNA de *Ilyonectria* spp. para o solo 9, em que a amostra foi recolhida antes da plantação de viveiro e para o solo 13, cuja recolha foi efectuada durante a plantação das estacas enxertadas. Quer num quer noutro caso, os proprietários das parcelas não procedem regularmente à desinfecção do solo com metame-sódio, um produto com acção fumigante destinado a combater nemátodes, mas com alguma acção fungicida. Por conseguinte, é provável que o ciclo de rotação levado a efeito nos solos de viveiro vitícola não seja por si só suficiente para reduzir as populações de *Ilyonectria* spp., mas o seu efeito, conjugado com a aplicação de metame-sódio, resulte na efectiva redução de inóculo.

Os valores mais baixos de concentração de DNA de *Ilyonectria* spp. registaram-se para solos recolhidos antes da plantação, nomeadamente para os solos 6, 7 e 8. Para as parcelas cuja recolha de solo foi efectuada após o enraizamento de enxertos prontos, não se registaram valores muito elevados comparativamente com os restantes, ainda assim globalmente superiores aos das parcelas em rotação (solos 6, 7 e 8). De salientar a baixa concentração de inóculo nos casos das parcelas 17 e 18, em que a cultura implantada anteriormente consistiu em cereais, nomeadamente sorgo, revelando-se esta cultura uma boa opção, como precedente de viveiro vitícola. Estudos anteriores demonstraram que culturas de cereais como o trigo podem estimular a comunidade microbiológica supressiva de fungos do solo (Mazzola *et al.*, 2002). Também sistemas incluindo Brassicaceas suprimem patogénios através da produção de aleloquímicos (Brown & Morra, 1997). Serão necessários estudos mais exaustivos e em anos repetidos para se poderem extrair conclusões mais fiáveis sobre o melhor elenco de culturas a seleccionar para a rotação dos solos de viveiro, com vista à redução de *Ilyonectria* spp., bem como a duração necessária do ciclo de rotação. Os resultados agora obtidos, ainda que preliminares, poderão constituir a base para estudos mais exaustivos.

3.4.3. Substrato

Através dos isolamentos microbiológicos realizados em substrato (turfa), colhido antes e depois da sua utilização, no processo de estratificação, não se detectaram fungos do género *Ilyonectria*, muito provavelmente pela menor sensibilidade da técnica. Quando o substrato foi analisado por nested-PCR verificou-se a presença de *Ilyonectria* spp., tanto em substrato não utilizado como após a sua utilização. Posteriormente, com recurso à técnica multiplex nested-PCR provou-se a existência de *I. liriodendri* e "*C.*" *pauciseptatum* na turfa antes da sua utilização e a de *I. macrodidyma*, *I. liriodendri* e "*C.*" *pauciseptatum*, após o processo de estratificação (Fig. 3.12).

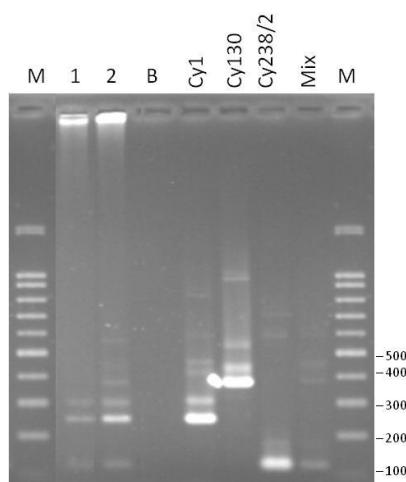


Fig. 3. 12. Produtos de amplificação obtidos por Multiplex nested-PCR, em gel de agarose 2%, utilizando três pares de iniciadores específicos Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2 e Pau1/MaPa2 para as espécies *Ilyonectria macrodidyma*, *Ilyonectria liriodendri* e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* respectivamente, para os substratos 1 (turfa antes da utilização) e 2 (após utilização). M - marcador molecular 100 bp (Bioron international, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha); B - controlo negativo; Cy1 - isolado de *Ilyonectria liriodendri*; Cy 130 - isolado de *Ilyonectria macrodidyma*; Cy 238/2 - isolado de "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*; Mix - junção dos isolados Cy1, Cy 130 e Cy 238/2.

Até à data, não foram encontradas referências a estudos realizados para a detecção de fungos *Ilyonectria* spp. em substratos utilizados na fase de estratificação em viveiro vitícola, mas a presença de *Pa. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. (agentes causadores da doença de Petri) em turfa, antes (Retief *et al.*, 2007) e após a respectiva utilização no processo de estratificação, é conhecida (Aroca *et al.*, 2010). Segundo os resultados obtidos no presente estudo, verifica-se um paralelismo entre o comportamento dos agentes causais da doença de Petri em substrato e o dos fungos do género *Ilyonectria*, o que constitui um dado novo e preocupante na epidemiologia da doença, com ênfase para as eventuais fontes de inóculo.

A presença de *Ilyonectria* spp. em substrato aparentemente estéril constitui um resultado inesperado, mas não é inédito em relação a outros fungos do solo. A título de exemplo, quando *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (fungo do solo responsável pela necrose do colo e da raiz do tomateiro) foi assinalado pela primeira vez em França, provou-se que as infecções tiveram origem em substratos infectados oriundos da Holanda (Couteaudier & Alabouvette, 1985).

3.4.4. Águas

Pelas técnicas de biologia molecular, foi possível detectar a presença de fungos do género *Ilyonectria* na água dos tanques de hidratação, tanto de garfos como de porta-enxertos, assim como em água do furo (Quadro 3.9).

Quadro 3. 9. Presença de *Ilyonectria* spp. em amostras de água dos tanques de hidratação e furo

Amostra de água	Isolamento Microbiológico	Biologia Molecular
Tanques de hidratação de garfos	-	+
Tanques de hidratação de estacas de porta-enxertos	-	+
Furo	-	+

Estes resultados são inéditos em relação a *Ilyonectria* spp., embora a contaminação da água dos tanques de hidratação seja conhecida para *Pa. chlamydospora* (Whiteman, 2004; Retief *et al.*, 2006). O resultado positivo para a água da torneira, proveniente de um furo e não da rede pública, pode explicar-se pela ocorrência de lixiviação arrastando propágulos de *Ilyonectria* spp. existentes na zona das raízes de campos próximos do ponto de captação de água. Ainda assim, este assunto deveria ser alvo de um estudo mais aprofundado.

Através da técnica Multiplex nested-PCR foi possível detectar diferentes espécies de *Ilyonectria* spp. para as diferentes amostras de água. Na água proveniente dos tanques de hidratação de garfos foi detectada a espécie *I. liriodendri*, na água proveniente dos tanques de hidratação de estacas de porta-enxertos, assim como na água proveniente do furo foram detectadas as espécies *I. liriodendri* e *I. macrodidyma* (Fig. 3.13).

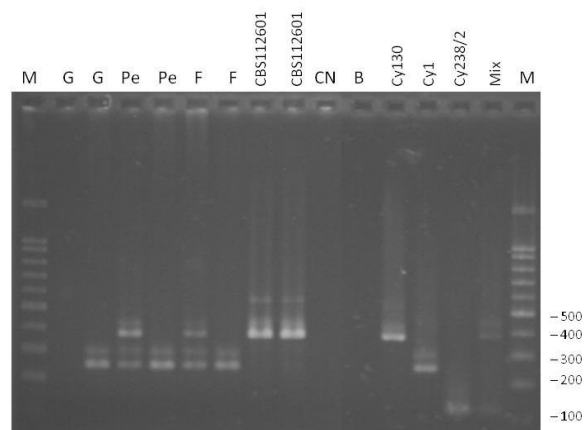


Fig. 3. 13. Produtos de amplificação por Multiplex nested-PCR, em gel de agarose 2%, utilizando três pares de iniciadores específicos Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2 e Pau1/MaPa2 para as espécies *Ilyonectria macrodidyma*, *Ilyonectria liriodendri* e "*Cylindrocarpon*" *pausicseptatum* respectivamente, para amostras de água dos tanques de hidratação de garfos (G), água dos tanques de hidratação das estacas de porta-enxertos (Pe) e água do furo (F). M - marcador molecular 100 bp (Bioron international, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha); CN e B - controlo negativo; CBS112601 - isolado de *Ilyonectria liriodendri* Cy1 - isolado de *Ilyonectria liriodendri*; Cy 130 - isolado de *Ilyonectria macrodidyma*; Cy 238/2 - isolado de "*Cylindrocarpon*" *pausicseptatum*; Mix - junção dos isolados Cy1, Cy 130 e Cy 238/2.

4. Conclusões e Perspectivas Futuras

O presente trabalho demonstrou que o material vegetal utilizado no processo de propagação da videira em viveiro vitícola encontra-se infectado por vários fungos associados ao pé-negro e ao declínio das vinhas jovens. Em estacas extraídas de vinhas-mãe dos porta-enxertos 1103P e 110R detectaram-se fungos dos géneros *Ilyonectria* spp. e *Phaeomoniella chlamydospora*, tal como Botryosphaericeae. Por sua vez, as varas destinadas a garfos, revelaram incidência muito elevada de fungos Botryosphaeriaceae, sobretudo na casta Touriga Nacional e elevada de *Ilyonectria* spp. (30-40%). Em contrapartida, não se isolou *Phaeomoniella chlamydospora*. A incidência elevada de *Ilyonectria* spp. em varas de videira é pouco usual, uma vez que não está comprovado que estes fungos de solo apresentem disseminação aérea.

Da análise realizada a enxertos-prontos de videira (colhidos após enraizamento em viveiro vitícola), obtiveram-se resultados comparáveis aos citados na literatura consultada e em que se destacam os seguintes:

- maior incidência dos fungos *Ilyonectria* na região basal do porta-enxerto, diminuindo essa incidência da base para a região de enxertia;
- menor incidência de fungos Botryosphaeriaceae na base do porta-enxerto, aumentando a incidência da base para o topo da planta;
- incidência nula de *Pa. chlamydospora*.

Ainda em enxertos-prontos, ao nível da casta os resultados obtidos afastaram-se de outros obtidos anteriormente, pela maior incidência de fungos *Ilyonectria* spp. Para consolidar os resultados acima descritos e para se ter a percepção exacta das fases críticas em que os materiais poderiam contrair infecções por *Ilyonectria* spp, ao longo de todo o processo de obtenção de enxertos-prontos, seleccionou-se como caso de estudo a combinação Touriga Nacional/110R.

No presente trabalho, e porque o objectivo era a detecção de possíveis fontes de inóculo para *Ilyonectria* spp. e "*C.*" *pauciseptatum*, apenas se efectuaram estudos de incidência (percentagem de plantas portadoras de fungos, relativamente ao total da amostra), mas ficaram por determinar valores de severidade, i.e., esclarecer qual o grau de colonização dos materiais vegetais por esses fungos. Este aspecto é muito importante, pois incidências elevadas não correspondem necessariamente a materiais muito infectados.

Ainda que se obtenha material vegetal são, a partir de vinhas-mãe, estes poderão vir a ser infectados por *Ilyonectria* spp. durante as várias fases do processo de propagação em viveiro, tal como se comprovou no presente estudo. O solo de viveiro revela-se uma fonte de

inóculo, no entanto, o sistema de rotação de três anos consecutivos entre plantações de viveiro na mesma parcela, exigidos por lei, poderá diminuir o nível de inóculo no solo. Futuramente, será necessário realizar estudos que permitam concluir qual a melhor combinação de culturas na rotação, visando a redução de *Ilyonectria* spp., assim como a duração necessária do ciclo de rotação.

Se a contribuição do solo para o aumento da incidência de pé-negro no final do enraizamento em viveiro era conhecida, desconhecia-se a existência de outras fontes de inóculo, em armazém. Através de técnicas de biologia molecular, foi possível detectar fungos *Ilyonectria* spp. e/ou "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* em água dos tanques de hidratação e no substrato de estratificação. Estes resultados estão em concordância com estudos realizados para outros fungos associados ao declínio das vinhas jovens (*Pa. chlamydospora*), revelando que o padrão de disseminação de *Ilyonectria* spp. em armazém poderá ser idêntico ao de *Pa. chlamydospora*. No entanto, para fundamentar esta conclusão será necessário prosseguir os estudos, de forma a aumentar a dimensão das amostras e a comprovar a viabilidade do inóculo detectado, uma vez que as técnicas biomoleculares usadas não permitem distinguir inóculo viável de inviável.

O presente estudo revelou ainda resultados que indiciam a disseminação aérea de fungos do género *Ilyonectria*. A ocorrência deste tipo de disseminação e o seu impacto na infecção de vinhas-mãe e dos materiais durante o processo de propagação em armazém e em viveiro deve ser objecto de investigação futura.

As técnicas de biologia molecular revelaram-se mais rápidas e sensíveis que as técnicas de isolamento clássico; no entanto, devido ao facto desta técnica não confirmar a viabilidade do DNA do patógeno, devem ser realizados estudos posteriores que se foquem na detecção de mRNA (possível apenas a partir de organismos vivos), que teoricamente sobrevive pouco tempo após a morte do patógeno.

Uma vez que os materiais produzidos em viveiro constituem um veículo de rápida propagação de agentes patogénicos, deve proceder-se ao controlo sanitário dos mesmos, de forma a minimizar as infecções. Face aos resultados obtidos e até que sejam desenvolvidos meios de luta mais eficazes contra o pé-negro da videira, recomenda-se o seguinte:

- proceder ao saneamento de vinhas-mãe, de forma a reduzir a incidência de fungos do lenho da videira;
- evitar, tanto quanto possível, o contacto das varas das vinhas-mãe de garfos com o solo e com as varas dos porta-enxertos, para evitar contaminações após a recolha das mesmas;

- renovar com assiduidade a água dos tanques de hidratação;
- proceder à imersão do material vegetal em agentes de natureza química (fungicidas ou desinfectantes) e/ou biológica;
- desinfetar regularmente os instrumentos de corte com álcool ou com hipoclorito de sódio;
- armazenar os materiais em câmaras frigoríficas e nunca à temperatura ambiente;
- manter a regular higiene do armazém;
- nos terrenos destinados a viveiro vitícola, introduzir gramíneas na rotação.

As fontes de inóculo identificadas para fungos do género *Ilyonectria* e, em certa medida, para "*C.*" *pauciseptatum*, constituem um passo importante no esclarecimento do ciclo da doença do pé-negro. O prosseguimento destes estudos poderá contribuir para a obtenção de material vitícola de qualidade e certificado no que diz respeito à presença de fungos do género *Ilyonectria*.

Referências Bibliográficas

- Abreo, E., Martinez, S., Bettucci, Lupo, S. 2010. Morphological and molecular characterisation of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevine in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 39, 446-452.
- Aguirre, A., Lobato, A., Muñoz, I., Valenzuela, J. 2001. Propagación de la vid. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación La Platina. Santiago, Chile. Boletín Técnico N°56.
- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., León, M., García-Jiménez, J., Armengol, J. 2011. Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and Petri disease pathogens. *Plant Disease* 95, 803-810.
- Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., Armengol, J. 2011. Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* and *Cylindrocarpon macrodidymum* *in vitro*, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. *Crop Protection* 30, 489-494.
- Alaniz, S., Armengol, J., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., León, M. 2009a. A multiplex PCR system for the specific detection of *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodidymum* and *C. pauciseptatum* from grapevine. *Plant Disease* 93, 821-825.
- Alaniz, S., Armengol, J., León, M., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P. 2009b. Analysis of genetic and virulence diversity of *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum* associated with black foot disease of grapevine. *Mycological Research* 113, 16-23.
- Alaniz, S., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., Armengol, J. 2010. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*. *Scientia Horticulturae* 125, 305-308.
- Alaniz, S., León, M., Vicent, A., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., Armengol, J. 2007. Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with Black foot disease of grapevines in Spain. *Plant Disease* 91, 1187-1193.
- Andrade, R., Fernandes, L., Böhm, J. 2007. A Produção de plantas vitícolas em Portugal. In: *O Grande Livro das Castas* (Jorge Böhm). Chaves Ferreira Publicações. pp. 60.
- Anónimo. 2005. La pépinière viticole française: objective qualité. Viniflor, FranceAgriMer (<http://www.onivins.fr>).
- Aroca, A., García-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J., Raposo, R. 2006. A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 126, 195-202.
- Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J., Raposo, R. 2010. Evaluation of grapevine nursery process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 126, 165-174.
- Aroca, A., Raposo, R. 2005. Occurrence of fungi associated with Petri disease in bench-grafted vines. *Phytopathologia Mediterranea* 44, 90.
- Aroca, A., Raposo, R. 2007. PCR-based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2911-2918.
- Bates, J. A., Taylor, E. J. A., Kenyon, D. M., Thomas, J. E. 2001. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seeds. *Molecular Plant Pathology* 2, 49-57.
- Bertelli, E., Mugnai, L., Surico, G. 1998. Presence of *Phaeoacremonium chlamydosporum* in apparently healthy rooted grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea* 37, 79-82.
- Billones, R., Jones, E. E., Ridgway, H. J., Jaspers, M. V. 2009. Prevalence and pathogenicity of *Botryosphaeria lutea* isolated from grapevine nursery material in New Zealand. In: *Proceedings of Australian Plant Pathology Conference*, Newcastle, NSW, Australia, 69.

- Billones, R., Jones, E. E., Ridgway, H. J., Jaspers, M. V. 2010. Botryosphaeriaceae infection in New Zealand grapevine nursery plant materials. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 115.
- Bleach, C. M., Jones, E. E., Jaspers, M. V. 2010. Biofumigation using brassicaceous plant products to control *Cylindrocarpon* black foot disease in New Zealand soils. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 128.
- Bleach, C. M., Jones, E. E., Jaspers, M. V. 2009. Hot water treatment for elimination of *Cylindrocarpon* species from infected grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 183.
- Booth, C. 1966. The Genus *Cylindrocarpon*. *Mycological Papers* 104, 1-54.
- Brayford, D. 1992. *Cylindrocarpon*. In *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. L. Singleton, J. D. Mihail & C. M. Rush (eds.). American Phytopathological Society, St. Paul, 103-106.
- Brown, P. D., Morra, M. J. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Advances in Agronomy* 61, 167-231.
- Cabral, A. 2002. Caracterização de isolados do género *Cylindrocarpon* causadores do pé-negro de videira. Relatório do trabalho de fim de curso. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. 156pp.
- Cabral, A., Groenewald, J. Z., Rego, C., Oliveira, H., Crous, P. W. 2011a. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycological Progress* (26 July 2011), pp. 1-34. doi:10.1007/s11557-011-0777-7.
- Cabral, A., Rego, C., Nascimento, T., Oliveira, H., Groenewald, J. W., Crous, P. 2011b. Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology* doi:10.1016/j.funbio.2011.09.010.
- Cenis, J. L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20, 2380.
- Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A. Y., Samuels, G. J. 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology* 68, 57-78.
- Couteaudier, Y., Alabouvette, C. 1985. Nécrose du collet et pourriture des racines de tomate. *P.H.M.-Revue Horticole* 254, 39-42.
- Crous, P. W. 2002. *Taxonomy and pathology of Cylindrocladium (Calonectria) and allied genera*. APS Press, St. Paul, MN, USA, 294 pp.
- Crous, P. W., Gams, W. 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov. a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 112-118.
- Crous, P. W., Swart, L., Coertze, S. 2001. The effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy cuttings. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S464-S466.
- Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., Samson, R. A. 2009. Fungal Biodiversity. *CBS Laboratory Manual Series* 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands.
- Damm, U., Fourie, P. 2005. A cost-effective protocol for molecular detection of fungal pathogens in soil. *South African Journal of Science* 101, 135-139.
- Decreto-Lei n.º 194/2006 de 27 de Setembro. 2006. Diário da República I Série - n.º 187. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Descottes, A., Moncomble, D., Virion, M. C. 1991. Pied noir. *Le Vigneron Champenois* 6, 30-45.
- Di Marco, S., Osti, F., Cesari, A. 2004. Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 108-115.
- Dubos, B. 1999. *Les maladies cryptogamiques de la vigne: les champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne*. Éditions Féret, Bourdeaux, 174 pp.
- Edwards, J., Laukart, N., Pascoe, I. G. 2001. *In situ* sporulation of *Phaeomoniella chlamydospora* in the vineyard. *Phytopathologia Mediterranea* 40, 61-66.

- Edwards, J., Pascoe, I. G. 2004. Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology* 33, 273-9.
- Edwards, J., Pascoe, I. G., Salib, S., Laukart, N. 2004. Hot water treatment of grapevine cuttings reduces incidence of *Phaeomoniella chlamydospora* in young vines. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 158-159.
- Eskalen, A., Rooney-Latham, S., Gubler, W. D. 2007. Identifying effective management strategies for esca and Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 125-126.
- Fourie P.H., F. Hallen. 2001a. Field and diagnostic observations of grapevine decline in South Africa. In: *Proceedings of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*, 17-20 September, Évora, Portugal, 58-60.
- Fourie, P. H., Halleen, F. 2002a. Pro-active control measures for Petri disease in grapevine nurseries. In "Abstracts of the 3rd Internacional Workshop on Grapevine Trunk Diseases". Lincoln University, Canterbury, New Zealand, 34.
- Fourie, P. H., Halleen, F. 2002b. Investigation on the occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. *Australasian Plant Pathology* 31, 425-426.
- Fourie, P. H., Halleen, F. 2004a. Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33, 313-315.
- Fourie, P. H., Halleen, F. 2004b. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease* 88, 1241-1245.
- Fourie, P. H., Halleen, F. 2005. Integrated strategies for proactive management of grapevine trunk diseases in nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 44, 111.
- Fourie, P. H., Halleen, F., Volkmann, A. S. 2000. Fungi associated with grape wood, root and trunk diseases: a summary of the 1999-2000 results from the diagnostic service at Nietvoorbij. In: *Proceedings of the 2nd International Viticulture and Enology Congress 8-10 November, 2000*. Cape Town, South Africa: Abstract, 12.
- Fourie, P. H., Halleen, F., Vyver, J. van der Schreuder, W. 2001. Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S473-S478.
- Fourie, P. H., Halleen, F. 2001a. Field observations of black goo decline and black foot disease of grapevine. In: *Proceedings of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*. 17-20 September, Évora, Portugal, 288-290.
- Fourie, P. H., Halleen, F. 2001b. Diagnosis of fungal disease and their involvement in dieback disease of young vines. *Wynboer* 149. 19-23.
- Fourie, P. H., Halleen, F. 2006. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 116. 255-265
- Fungaro, M. H. 2000. PCR na Micologia. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 14, 12-16.
- Gachon, C., Mingam, A. C. B., Charrier, B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany* 55, 1445-1454.
- Giménez-Jaime, A., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J., Armengol, J. 2006. Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology* 154, 598-602.
- Graham, A. 2007. Hot water treatment of grapevine rootstock cuttings grown in a cool climate. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 124.
- Gramaje, D., Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., Armengol, J. 2010. Effect of hot water treatment *in vitro* on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. *Annals of Applied Biology*, 231-241.

- Gramaje, D., Armengol, J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potencial inoculum sources, detection, identification and management strategies. *Plant Disease* 95, 1040-1054.
- Gramaje, D., Armengol, J., Salazer, D., López-Cortés, I., García-Jiménez, J. 2009a. Effect of hot-water treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. *Crop Protection* 28, 280-285.
- Gramaje, D., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J., Armengol, J. 2009b. Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. *Crop Protection* 28, 1091-1097.
- Gramaje, D., Muñoz, R. M., Lerma, M. L., García-Jiménez, J., Armengol, J. 2009c. Fungal grapevine trunk pathogens associated with Syrah decline in Spain. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 396-402.
- Grasso, S. 1984. Infezioni de *Fusarium oxysporum* e di *Cylindrocarpon destructans* associate a una moria di giovani piante di vite in Sicilia. *Informatore Fitopatologico* 34, 59-63.
- Grasso, S., Magnano di San Lio, G. 1975. Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporum* su piante di vite in Sicilia. *Vitis* 14, 36-39.
- Gubler, W. D., Baumgartner, K., Browne, G. T., Eskalen, A., Rooney Latham, S., Petit, E., Bayramian, L. A. 2004. Root disease of grapevines in California and their control. *Australasian Plant Pathology* 33, 157-165.
- Gyrão, A. L. Ferreira Teixeira (1822). *Tratado Teórico e Prático*. p. VI-XXXV.
- Habib, W., Pichierri, A., Masiello, N., Pollastro, S., Faretra, F. 2009. Application of water treatment to control *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine plant propagation materials. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 186.
- Halleen, F., Crous, P. W. 2001. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in the Western Cape province. In *Abstracts of 39th Congress of the Southern African Society of Plant Pathology*. Nelspruit, January 21-24, P38, 104.
- Halleen, F., Crous, P. W., Petrini, O. 2003. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved on the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology* 32, 47-52.
- Halleen, F., Fourie, P. H., Crous P. W. 2006a. A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S55-S67.
- Halleen, F., Fourie, P. H., Crous, P. W. 2007. Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology* 56, 637-645.
- Halleen, F., Schroers, H. J., Groenewald, J. Z., Rego, C., Oliveira, H. and Crous, P. W. 2006b. *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines. *Studies in Mycology* 55, 227-234.
- Halleen, F., Schroers, H.-J., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. 2004. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology* 50, 431-455.
- Hamelin, R. C., Bérubé, P., Gignac, M., Bourassa, M. 1996. Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4026-4031.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. E., Geneve, R. 2001. *Hartmann and Kester's plant propagation: Principles and practices*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Hidalgo, L. 2002. *Tratado de Viticultura General*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Spain.
- Hunter, J. J., Volschenk, C. G., Le Roux, D. J., Fouché, G. W., Adams, L. 2004. *Plant material quality, a compilation of research*. Research Reports, ARC Infruitec-Nietvoorbij, Stellenbosch, South Africa.
- Jackson, R. S. 2008. *Wine science principles and applications*. APS, Saint Louis, USA.
- Jarvis, W. R. 1988. *Fusarium crown* and root rot of tomatoes. *Phytoprotection* 69, 49-64.

- Jaspers, M. V., Bleach, C. M., Harvey, I. C. 2007. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon* disease. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 114.
- Klein, P.G., Juneja, V.K., 1997. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4441-4448.
- Kotze, C., van Niekerk, J. M., Halleen, F., Fourie, P. H. 2009. Identifying potential biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogens infection. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 184.
- Larignon, P. 1999. Black foot disease in France. In: Morton L., ed. *Proceedings of the Seminar and Workshop on Black Goo Symptoms and Occurrence of Grape Declines*, 1998. Fort Valley, VA, USA: International Ampelography Society, 89-90.
- Lievens, B., Claes, L., Vanachter, A., Cammue, B., Thomma, B. 2006. Real time PCR for detection and quantification of fungal and Oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science* 171, 155-165.
- Magalhães, N. 2008. *Tratado de viticultura - A videira, a vinha e o terroir*. Chaves Ferreira Publicações. Lisboa. p. 166-171.
- Maluta, D., Larignon. 1991. Pied-noir: miexs vaut prévenir. *Vitis Novembre*, 71-72.
- Martín, M. T., Martín, L., Cuesta, M. J. 2011. First report of *Cylindrocarpon pauciseptatum* associated with grapevine decline from Castilla e León, Spain. *The American Phytopathological Society*. 95, 361.3
- Martínez, J. R., Salazar, D. M., Lopéz, I. 2004. Prevención y consideraciones básicas ante la presencia de la enfermedad de Petri (I). *La semana vitivinícola* nº 3000, 406-409.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J. C., Soulas, G., Catroux, G. 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2354-9.
- Matturi, S. T., Stenton, H. 1964. Distribution and status in the soil of *Cylindrocarpon* species. *Transactions of the British Mycological Society* 47, 577-587.
- Mazzola, M., Granatstein, D. M., Elfving, D. C., Mullinix, K., Gu Y. 2002. Cultural management of microbial community structure to enhance growth of apple in replant soils. *Phytopathology* 92, 1363-1366.
- McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., Ward, E. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59, 129-142.
- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L., Ghiorse, W. C. 1999. Evaluation and optimisation of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4715-4724.
- Mostert, L., Safodien, S., Crous, P. W., Fourie, P. H., Halleen, F. 2010. Molecular detection of *Cylindrocarpon* and *Campylocarpon* species associated with black foot disease of grapevines in South Africa. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 116-117.
- Mutawila, C., Halleen, F., Fourie, P. H., Mostert, L. 2010. *In vitro* growth of reporter gene transformed *Trichoderma harzianum*, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Eutypa lata* on the grapevine pruning wound and histology of the wood response to infection. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 126.
- Nascimento, T., Rego, C., Oliveira, H. 2001. Detection of *Cylindrocarpon* black-foot pathogens in grapevine by nested PCR. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S357-S361.
- Nascimento, T., Rego, C., Oliveira, H. 2007. Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 218-224.
- Nicholas, P. R., Chapman, A. P., Ciriaco, R. M. 2001. Grapevine Propagation. In: *Viticulture*, Vol. 2, Practices. (B. G. Coombe & P. R. Dry). eds. Winetitles. p. 1-22.
- Oliveira, H., Nascimento, T., Rego, M. C. 1998. Crown gall and *Cylindrocarpon* black foot diseases of grapevine in Portugal. In: *Proceedings of the 19th International Geisenheim Workshop Grapevine Grafting*. Geisenheim, Germany 2-4 July p. 23-34.

- Oliveira, H., Rego, C. 2007. O diagnóstico das doenças do lenho da videira. In: *O Grande Livro das Castas* (Jorge Böhm). Chaves Ferreira Publicações. pp. 70-71.
- Oliveira, H., Rego, C., Farropas, L., Nascimento, T. 2003. As dificuldades no combate a doenças da vinha: podridões radiculares e doenças do lenho. In: *Colóquio "A Protecção Integrada da Vinha"*, P. Amaro (ed.), 16 de Outubro, Évora, Portugal, 41-49.
- Oliveira, H., Rego, C., Nascimento, T. 2004. Decline of young grapevines caused by fungi. *Acta Horticulturae* 652, 295-304.
- Oliveira, H., Rego, C., Teixeira Santos, M., Nascimento, T., Cabral, A. 2007. Declínio das videiras jovens: novos desenvolvimentos. In *Actas 7º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*. Évora, Vol. 1, 25 de Maio, 75-85.
- Pascoe, I. G., Cottral, E. H. 2000. Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*. 39, 68-75.
- Peixe, A., Böhm, J. 2007. A propagação de material vitícola em Portugal. In: *O Grande Livro das Castas* (Jorge Böhm). Chaves Ferreira Publicações. pp. 61-62.
- Peterson, E. A. 1958. Observations of fungi associated with plant roots. *Canadian Journal of Microbiology*. 4, 257-265.
- Petit, E., Gubler, W.D. 2006. Influence of *Glomus intraradices* on black foot disease caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* under controlled conditions. *Plant Disease* 90, 1481-1484.
- Petit, E., Gubler, W.D. 2005. Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease* 89. 1051-1059.
- Phillips A. J. L. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevine in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 3-18.
- Pinto, R., Rodrigues, T., Nascimento, T., Rego, C., Oliveira, H. 2005. Micoflora associada ao declínio de plantas-mãe de porta-enxertos de videira. In *A Produção Integrada e a Qualidade e Segurança Alimentar*, Ed. IPC, Vol 1: 191-199.
- Probst, C. M., Jaspers, M. V., Jones, E. E., Ridgway, H. J. 2010. A quantitative PCR method for detecting two *Cylindrocarpon* species in soil. *Phytopathologia Mediterranea*. 49. 115.
- Rayner, R. W. 1970. A Mycological Colour Chart. *British Mycological Society and CAB International Mycological Institute*, Kew.
- Rego C., Cabral A., Nascimento T., Oliveira H. 2003. Obtenção do teleomorfo de *Cylindrocarpon destructans*, *Neonectria radicola*. In: *6º Encontro Nacional de Protecção Integrada*, Castelo Branco, 14-16 Maio, 349-356.
- Rego, C. 1994. Nova e grave doença da videira em Portugal. Agente responsável: *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten. Publicação do *Laboratório de Patologia Vegetal "Veríssimo de Almeida"* 67, 1-4.
- Rego, C. 2004. *Estudo e caracterização de fungos do género Cylindrocarpon (Neonectria) responsáveis pelo pé-negro da videira em Portugal*. Dissertação apresentada ao Laboratório de Patologia Vegetal "Veríssimo de Almeida" - Instituto Superior de Agronomia, para acesso à categoria de Investigador Auxiliar, ISA/LPVVA, UTL, Lisboa.
- Rego, C., Farropas, L., Nascimento, T., Cabral, A., Oliveira, H. 2005. Black foot of grapevine: sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathologia Mediterranea* 44, 118-119.
- Rego, C., Farropas, L., Nascimento, T., Cabral, A., Oliveira, H. 2006a. Black foot of grapevine: sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathologia Mediterranea* 45, 93-100.
- Rego, C., Farropas, L., Nascimento, T., Oliveira, H. 2001a. First approach on the understanding of inoculum sources of *Cylindrocarpon destructans* and *Phaeomoniella chlamydospora* concerning grapevine rootstocks in Portugal. *IOBC wprs Bulletin* 24, 67-72.

- Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A., Oliveira, H. 2005. Fungi associated with young vine decline in Portugal: results of nine years surveys. *IOBC wprs Bulletin* 29, 123-126.
- Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A., Oliveira, H. 2006b. Fungi associated with young vine decline in Portugal: results of nine years surveys. *IOBC wprs Bulletin* 29, 123-126
- Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A., Silva, M. J., Oliveira, H. 2009. Control of grapevine wood fungi in commercial nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 128-135.
- Rego, C., Nascimento, T., Oliveira, H. 2001b. Characterization of *Cylindrocarpon destructans* isolates from grapevine in Portugal. *Phytopatologia Mediterranea* 40, S343-S350.
- Rego, C., Oliveira, H., Carvalho, A., Phillips, A. 2000. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 76-79.
- Reis, P. 2010. Caracterização de fungos do género *Cylindrocarpon* obtidos numa vinha com sintomas de declínio. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. 71 pp.
- Retief, E., Damm, U., van Niekerk, J.M., McLeod, A. and Fourie, P.H. 2005. A protocol for molecular detection of *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine wood. *South African Journal of Science* 101, 139- 142.
- Retief, E., McLeod, A., Fourie, P. H. 2006. Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology* 115. 331-339.
- Retief, E., McLeod, A., Fourie, P. H. 2007. Molecular detection of potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine nurseries. Wynboer, Julho (www.wynboer.co.za/recentarticles/articles.ph3).
- Ridgway, H. J., Sleight, B. E., Stewart, A. 2002. Molecular evidence for the presence of *Phaeomoniella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR. *Australasian Plant Pathology* 31, 267-271.
- Rolshausen, P. E., Wilcox, W., Baumgartner, K. 2010. Distribution and occurrence of fungi associated with grapevine trunk diseases in Northeastern American vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 105.
- Rooney, S. N., Gubler, W. D. 2001. Effect of water treatments on eradication of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from dormant grapevine wood. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S467-S472.
- Rooney, S., Eskalen, A., Gubler, W. D. 2001. Recovery of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from soil and grapevine tissues. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S351-S356.
- Rowe, R. C., Farley, J. D., Coplin, D. L. 1977. Airborne spore dispersal and recolonization of steamed soil by *Fusarium oxysporum* in tomato greenhouses. *Phytopathology* 67, 1513-1517.
- Rumbos, I., Rumbou, A. 2001. Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathologia Mediterranea*. 40, S330-S335.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1695 pp.
- Samuels, G. J., Brayford, D. 1990. Variation in *Nectria radicola* and its anamorph, *Cylindrocarpon destructans*. *Mycological Research* 94, 433-442.
- Schaad, N. W., Frederick, R. D. 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24, 250-258.
- Scheck, H. J., Vasquez, S. J., Gubler, W. D.. 1998a. First report of black-foot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporium*, of grapevine in California. *Plant Disease* 82, 448.
- Scheck, H., Vasquez, S., Folge, D., Gubler, W. D. 1998b. Grape growers report losses to black foot and grapevine decline. *California Agriculture* 52, 19-23

- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., Gallitelli, D. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 110, 893-908.
- Schroers, H.-J., Zerjav, M., Munda, A., Halleen, F., Crous, P. W. 2008. *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. *Mycological Research* 112, 82-92.
- Serra, S., Mannoni, M. A., Ligios, V., Demontis, A. 2009. Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 177.
- Sidoti, A., Buonocore, E., Serges, T., Mugnai, L. 2000. Decline of young grapevines associated with *Phaeoacremonium chlamydosporum* in Sicily (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 39, 87-91.
- Sweetingham, M. 1983. *Studies on the nature and pathogenicity of soilborne Cylindrocarpon spp.* Ph.D. Thesis, University of Tasmania.
- Tewoldemedhin, Y. T., Mazzola, M., Mostert, L., McLeod, A. 2011. *Cylindrocarpon* species associated with apple trees roots in South Africa and their quantification using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 129, 637-651.
- Traquair, J. A. 1995. Fungal biocontrol of root diseases: endomycorrhizal suppression of *Cylindrocarpon* root rot. *Canadian Journal of Botany* 73 (Suppl. 1): S89-S95.
- van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen, F., Crous, P. 2006. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S43-S54.
- Vaz, A. 2008. *Doenças causadas por fungos Botryosphaeria em videira: Caracterização fenotípica e molecular de isolados e sensibilidade a fungicidas*. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. 74 pp.
- Vigues, V., Yobregat, O., Barthélémy, B., Dias, F., Coarer, M., Girardon, K., Berud, F., Muller, M., Larignon, P. 2010. Wood decay diseases: tests of disinfection methods in French nursery. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 130-131.
- Waite, H. 2010. Trunk diseases and vine failure: The costs of poor quality propagating and planting material. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* 555, 21-22.
- Waite, H., May, P. 2005. The effects of hot water treatment, hydration and order of nursery operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars. *Phytopathologia Mediterranea* 44, 144-152.
- Waite, H., Morton, L. 2007. Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 5-17.
- Weaver, R. J. 1976. *Grape Growing*. John Wiley & Sons, New York.
- Weir, B. S., Graham, A. B. 2008. Development of an advanced PCR technique to detect grapevine trunk diseases. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* 532, 27-29.
- Weir, B. S., Graham, A. B. 2009. Simultaneous identification of multiple fungal pathogens and endophytes with database t-RFLP. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 163-164.
- Whitelaw-Weckert, M. A. 2004. *In vitro* inhibition of grapevine root pathogens by vineyard soil bacteria and actinomycetes. In: *Proceedings of the 3rd Australasian Soilborne Diseases Symposium* (K. M. Ophel Keller & B. H. Hall Eds) South Australian Research and Development Institute, Adelaide. pp. 129-130.
- Whitelaw-Weckert, M. A. 2010. Interaction between *Cylindrocarpon* and glyphosate in young vine decline. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 103-133.
- Whiteman, S. A., Jaspers, M. V., Stewart, A., Ridgway, H. J. 2002. Detection of *Phaeomoniella chlamydospora* in soil using species-specific PCR. *New Zealand Plant Protection* 5, 139-145.
- Whiteman, S. A., Jaspers, M. V., Stewart, A., Ridgway, H. J. 2004. *Phaeomoniella chlamydospora* detection in the grapevine propagation process by species-specific PCR. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 156.
- Whiting, E. C., Khan, A., Gubler, W. D. 2001. Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Plant Disease* 85, 195-201.

- Whittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., Rasmussen, R. P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22, 130-138.
- Winkler, A. J., Cook, J. A., Kliewer, W. M., Lider, L. A. 1974. *General viticulture*, University of California Press, Berkeley.
- Zanzotto, A., Gardiman, M., Lovat, L. 2008. Effect of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* sp. on *in vitro* grapevine plants. *Scientia Horticulturae* 116, 404-408.
- Zanzotto, A., Serra, S., Viel, W., Borgo, M. 2001. Investigation into the occurrence of esca associated fungi in cuttings and bench-grafted vines. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S311-S316.

ANEXOS

Quadro A. Características de isolados de referência utilizados na caracterização cultural

Species	Strain number ^a	Collected/isolated by, Year	Isolated from	Location
<i>Ilyonectria liriodendri</i> , type strain of "C." <i>liriodendri</i>	CBS 110.81; IMI 303645	J.D. MacDonald & E.E. Butler, 1978	<i>Liriodendron tulipifera</i> , root	USA, California, Yolo Co., Davis
<i>Ilyonectria liriodendri</i>	CBS 117640; IMI 357400; Cy1	C. Rego, 1992	<i>Vitis vinifera</i> , 4-year-old plant showing decline symptoms, scion Seara Nova; rootstock 99R	Portugal, Torres Vedras, Dois Portos
<i>Ilyonectria liriodendri</i>	CBS 117526; Cy68	C. Rego, 1999	<i>Vitis vinifera</i> , asymptomatic rootstocks; rootstock 99 R, clone 179F	Portugal, Ribatejo e Oeste
<i>Ilyonectria robusta</i> , type strain of <i>Ramularia robusta</i>	CBS 308.35	A.A. Hildebrand	<i>Panax quinquefolium</i>	Canada, Ontario
<i>Ilyonectria robusta</i>	Cy158	C. Rego & T. Nascimento, 2004	<i>Vitis vinifera</i> , 1-year-old, died before sprouting; scion Alicante Bouschet; rootstock 1103P	Portugal, Lamego, Cambres
<i>Ilyonectria robusta</i>	CBS 129084; Cy192	N. Cruz, 2005	<i>Vitis vinifera</i> , basal end of 25-year-old plant; scion Alicante; rootstock 196-17	Portugal, Monção
<i>Ilyonectria pseudodestructans</i>	Cy22	C. Rego, 1996	<i>Vitis vinifera</i> , 5-year-old, showing decline symptoms, scion Aragonez; rootstock 99R	Portugal, Viseu, Silgueiros
<i>Ilyonectria europaea</i>	Cy155	C. Rego & H. Oliveira, 2004	<i>Vitis vinifera</i> , 2-year-old, showing decline symptoms, scion Alfrocheiro; rootstock SO4	Portugal, Alter do Chão
<i>Ilyonectria europaea</i>	CBS 129078; Cy241	C. Rego, 2008	<i>Vitis vinifera</i> , basal end of a 2-year-old plant; scion Petit Verdot; rootstock 110R	Portugal, Vidigueira
<i>Ilyonectria lusitanica</i>	CBS 129080; Cy197	N. Cruz, 2005	<i>Vitis vinifera</i> , below grafting zone, 6-year-old plant; scion Alvarinho; rootstock 196-17	Portugal, Melgaço, Alvaredo
<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>	Cy196	N. Cruz, 2005	<i>Vitis vinifera</i> , basal end of 4-year-old plant; scion Alvarinho; rootstock 196-17	Portugal, Melgaço/Monção

Quadro A. Características de isolados de referência utilizados na caracterização cultural (continuação)

Species	Strain number ^a	Collected/isolated by, Year	Isolated from	Location
<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>	Cy217	A. Cabral, 2007	<i>Vitis vinifera</i> , asymptomatic; scion Gouveio	Portugal, Torres Vedras
" <i>Cylindrocarpon</i> " sp 2	Cy108	C. Rego, 1999	<i>Vitis vinifera</i> , basal end of a 4-year-old plant showing decline symptoms; scion Aragonez; rootstock SO4	Portugal, Nelas
" <i>Cylindrocarpon</i> " sp 2	Cy200	N. Cruz, 2005	<i>Vitis vinifera</i> , basal end of a 16-year-old plant; scion Alvarinho; rootstock 196-17	Portugal, Melgaço
<i>Ilyonectria estremocensis</i>	Cy144	C. Rego & T. Nascimento, 2003	<i>Vitis vinifera</i> , grafting zone of a 1.5-year-old plant showing decline symptoms; scion Aragonez; rootstock 3309C	Portugal, Estremoz
<i>Ilyonectria estremocensis</i>	CBS 129085; Cy145	C. Rego & T. Nascimento, 2003	<i>Vitis vinifera</i> , basal end of a 1.5-year-old plant showing decline symptoms; scion Aragonez; rootstock 3309C	Portugal, Estremoz
<i>Ilyonectria alcacerensis</i>	Cy134; IAFM Cy20-1	J. Armengol	<i>Vitis vinifera</i>	Spain, Ciudad Real, Villarubia de los Ojos
<i>Ilyonectria novozelandica</i>	CBS 112593; STE-U 3990; C 107	F. Halleen, 2000	<i>Vitis vinifera</i> , roots of an asymptomatic nursery plant; scion Pinotage; rootstock 101-14 Mgt	South Africa, Western Cape, Wellington, Voorgroenberg
<i>Ilyonectria novozelandica</i>	CBS 113552; STE-U 5713; HJS-1306; NZ C 41	R. Bonfiglioli, 2003	<i>Vitis</i> sp. decline of nursery plants dead rootstocks	New Zealand, Candy P New Ground
<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	CBS 112603; STE-U 4007; C 8	F. Halleen, 1999	<i>Vitis vinifera</i> , trunk of a plant showing decline symptoms, scion Sauvignon blanc; rootstock Richter 110	South Africa, Western Cape, Darling
<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	CBS 112601; STE-U 3983; C 82	F. Halleen, 1999	<i>Vitis vinifera</i> , roots with black foot symptoms; scion Pinotage; rootstock US 8-7	South Africa, Western Cape, Tulbagh

Quadro A. Características de isolados de referência utilizados na caracterização cultural (continuação)

Species	Strain number ^a	Collected/isolated by, Year	Isolated from	Location
<i>Ilyonectria macrodidyma</i> holotype of <i>C. macrodidymum</i>	CBS 112815; STE-U 3976; C 98	F. Halleen, 2000	<i>Vitis vinifera</i> , roots, asymptomatic nursery grapevine plant scion Sultana; rootstock 143-B Mgt	South Africa, Western Cape, Malmesbury
<i>Ilyonectria torresensis</i>	Cy136	C. Rego & T. Nascimento, 2003	<i>Vitis vinifera</i> , basal end of a 1.5-year-old plant showing decline symptoms; scion Aragonez; rootstock 3309C	Portugal, Estremoz
<i>Ilyonectria torresensis</i>	CBS 129086; Cy218	A. Cabral, 2007	<i>Vitis vinifera</i> , asymptomatic; scion Chenin	Portugal, Torres Vedras

Quadro B. Material armazenado em Armazéns e Câmaras de uma empresa de produção de videiras enxertadas no momento da colheita

Local	Data de Recolha							
	12.02.2011	26.02.2011	12.03.2011	26.03.2011	09.04.2011	23.04.2011	07.05.2011	
Armazém 1	Caixas com enxertos prontos para entrega	Linha de embalagem e caixas de enxertos-prontos	Linha de embalagem e caixas de enxertos-prontos	Enxertia	Enxertia	Enxertia	-	
Armazém 2	Varas, porta-enxertos, enxertos prontos	Enxertos-prontos	Enxertos-prontos, varas e estacas de porta-enxerto	Enxertos-prontos, varas e estacas de porta-enxerto	Paloxes com plantas enxertadas	Paloxes com plantas enxertadas	Paloxes com plantas enxertadas	
Armazém 3	Corte de porta-enxertos	Poda de enxertos prontos e corte de estacas de enxertos prontos	Corte de estacas de porta-enxerto e limpeza de varas	-	Paloxes com plantas estratificadas antes da plantação	Paloxes com plantas estratificadas antes da plantação	Paloxes com plantas estratificadas antes da plantação	
Câmara 1	Caixas de enxertos-prontos	Caixas com enxertos-prontos	Caixas com enxertos-prontos	Caixas com enxertos prontos	Caixas de enxertos prontos	Caixas de enxertos prontos	Caixas de enxertos prontos	
Câmara 2	Caixas de enxertos-prontos	Caixas com enxertos-prontos	Caixas de enxertos-prontos	Caixas de enxertos prontos	Caixas de enxertos prontos	Caixas de enxertos prontos	Caixas de enxertos prontos	
Câmara 3	Caixas de enxertos-prontos	Caixas com enxertos-prontos	Caixas com enxertos-prontos	Caixas de enxertos prontos	Caixas de enxertos prontos	Caixas de enxertos prontos	Caixas de enxertos prontos	
Câmara 4	Caixas de enxertos-prontos	Caixas com enxertos-prontos	Caixas com enxertos-prontos	Caixas com enxertos prontos	Caixas com enxertos prontos	Caixas com enxertos prontos	Caixas com enxertos prontos	
Câmara 5	Varas e estacas de porta-enxertos	Varas e estacas de porta-enxerto	Varas e estacas de porta-enxerto	Varas e estacas de porta-enxerto	Varas e estacas de porta-enxerto	Varas e estacas de porta-enxerto	Varas e estacas de porta-enxerto	
Câmara 6	Enxertos-prontos e estacas de porta-enxerto	Enxertos prontos e estacas de porta-enxerto	Enxertos-prontos e estacas de porta-enxerto	Enxertos-prontos e estacas de porta-enxerto	Estratificação de enxertos	Estratificação de enxertos	Estratificação de enxertos	
Câmara 7	Caixas com enxertos-prontos	Caixas de enxertos-prontos	Varas e caixas de enxertos-prontos	Varas e caixas de enxertos-prontos	Estratificação de enxertos	Estratificação de enxertos	Estratificação de enxertos	
Câmara 8	Varas e estacas de porta-enxerto	Varas e estacas de porta-enxerto	Varas e estacas de porta-enxerto	Varas e estacas de porta-enxerto	Varas e estacas de porta-enxerto	Varas e estacas de porta-enxerto	Varas e estacas de porta-enxerto	

Quadro C. Códigos atribuídos aos isolados provenientes de diferentes tipos de amostras

Descrição da amostra	Código atribuído aos isolados
Solo 9	CyMC 1, CyMC 2, CyMC 3
Solo 10	CyMC 4
Solo 12	CyMC 5, CyMC 6, CyMC 7, CyMC 8, CyMC 9, CyMC 10, CyMC 11, CyMC 12, CyMC 13, CyMC 14, CyMC 15, CyMC 16, CyMC 17, CyMC 18, CyMC 19, CyMC 20, CyMC 21, CyMC 22, CyMC 23, CyMC 24, CyMC 25, CyMC 26, CyMC 27
Solo 22	CyMC 28, CyMC 29, CyMC 30, CyMC 31, CyMC 47
Ar da câmara 8	CyMC 32, CyMC 33
Nível acima da enxertia de enxertos-prontos Alicante Bouschet x 1103P	CyMC 34, CyMC 35
Nível abaixo da enxertia de enxertos-prontos Alicante Bouschet x 1103P	CyMC 36, CyMC 37, CyMC 38
Nível basal de enxertos-prontos Alicante Bouschet x 1103P	CyMC 39
Nível basal de enxertos-prontos Fernão Pires x 1103P	CyMC 40, CyMC 41, CyMC 42, CyMC 43, CyMC 44, CyMC 45, CyMC 46
Nível basal de enxertos-prontos Jaen x 99R	CyMC 48, CyMC 49, CyMC 50, CyMC 51, CyMC 52, CyMC 53, CyMC 54, CyMC 55, CyMC 56, CyMC 57, CyMC 58, CyMC 59, CyMC 60
Nível basal de enxertos-prontos Moscatel Roxo x 110R	CyMC 61, CyMC 62
Nível abaixo da enxertia de enxertos-prontos Rabigato x 110R	CyMC 63, CyMC 64
Nível basal de enxertos-prontos Touriga Nacional x 1103P	CyMC 65, CyMC 66